

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

CAMILLA BORGES FERREIRA GOMES
Cirurgiã-dentista

***CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS ANTITUMORAL E
ANTIANGIOGÊNICA INDUZIDAS PELO TRATAMENTO COM
BISFOSFONATOS EM LINHAGEM CELULAR DERIVADA DE
CÂNCER DE MAMA***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Estomatologia

Orientador: Prof^a Dr^a Karina Gottardello Zecchin

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno, e orientada pelo Prof^a Dr^a Karina Gottardello Zecchin

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

G585c Gomes, Camilla Borges Ferreira, 1984-
Caracterização de respostas antitumoral e antiangiogênica
induzidas pelo tratamento com bisfosfonatos em linhagem celular
derivada de câncer de mama / Camilla Borges Ferreira Gomes. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Karina Gottardello Zecchin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Angiogênese. 2. Clodronato 3. Ácido clodrônico. 4 I.
Zecchin, Karina Gottardello. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Characterization of antitumoral and antiangiogenic
responses induced by treatment with bisphosphonates in breast cancer cell
line

Palavras-chave em Inglês:

Angiogenesis
Clodronate
Zoledronic acid
MCF-7

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca examinadora:

Karina Gottardello Zecchin [Orientador]
Giovanna Rosa Degasperi
Ricardo Della Coletta

Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata CAMILLA BORGES FERREIRA GOMES aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Karina Zecchin".

Profa. Dra. KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Giovanna Rosa Degasperis".

Profa. Dra. GIOVANNA ROSA DEGASPERI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ricardo Della Coletta".

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **José Nilson e Miriam**, que são meu tudo, agradeço por todo carinho, dedicação e completa doação. Devo toda minha formação a vocês.*

*A minha voinha **Luana** “In Memoriam” que sempre demonstrou seu grande amor, e que de maneira inexplicável, me ajudou nesta caminhada.*

*Aos meus **irmãos: Victor, Larissa, André, Samuel e Luana** pelo companherismo, amizade e apoio.*

*A toda minha **família e amigos** de Fortaleza, em especial minhas **tias**, que nunca mediram esforços em me “acudir” e incendiar o que há de melhor em mim.*

*À minha orientadora Professora Dra. **Karina Gottardello Zecchin**, pela enorme paciência e humildade como me conduziu, soube me ajudar a encontrar o meu melhor, num “mundo” tão novo, que foi de grande aprendizado para mim.*

Meu profundo agradecimento pela compreensão, confiança e oportunidades que me ofereceu. A finalização deste trabalho é uma conquista que compartilhamos juntas, fruto de sua orientação.

"Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A educação não consegue; o mundo é cheio de errantes educados. A persistência e determinação são onipotentes"

Calvin Coolidge

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído e realizado com o apoio de muitas pessoas dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**;

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo zelo e preocupação com nós alunos, que foi além da sua função de professor e coordenador.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, por toda sua paciência e orientação direta ou indireta na minha pesquisa.

Aos Profs. Drs. **Alan Roger dos Santos Silva, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Augustin Vargas, Ricardo Della Coletta**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pelo exemplo de mestres, que fizeram despertar cada vez mais o meu interesse por essa área, a partir da competência e seriedade que conduzem suas funções de ensino e pesquisa nesta instituição.

Às Prof^{as} Dr^{as}. **Ana Marisa Chudzinski-Tavassi e Miryam Paola Alvarez Flores** do instituto Butantan, pela contribuição e disponibilidade com que auxiliaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas do laboratório **Andréinha, Ana Camila, Elizabete, Isadora e Priscila** por facilitarem uma convivência harmoniosa no nosso ambiente de trabalho, em especial a **Luciana**, pela amizade consolidada.

À Prof^a Dr^a . **Michelle Agostini** pelos auxílios com sabedoria e pela leitura de citometria de fluxo, juntamente com **Andréa** e **Flávia**.

De forma especial as amigas, **Débora**, **Fabiana** e **Rose** pelas constantes ajudas, co-orientações e conselhos que foram além da bancada do laboratório. Deixo minha admiração e especial agradecimento.

As amigas-irmãs, que se tornaram cada vez mais especiais, **Mari**, **Andréa** (Xéxs) e **Manú**, por todo apoio, companherismo durante esses anos, sei que posso contar a qualquer hora, deixo meu sincero reconhecimento.

À família “village”: **Andréa**, **Felipe** e **Yuri**, que compartilharam comigo momentos de *stress* à alegres. Meu profundo agradecimento pela amizade e convivência, tornando menor a saudade de Casa.

Aos demais amigos de pós-graduação, **Alicia**, **Bruno**, **Fernanda**, **Karina**, **Katya**, **Lara**, **Marisol**, **Marcondes**, **Patrícia**, **Rodrigo**, **Rogério**, **Sabino**, **Tânia**, **Wilfredo** e **Victor**, pelos momentos de estudo e diversão compartilhados.

Aos amigos da radiologia, em especial à **Débora**, pela acolhida, amizades e divertimentos garantidos.

Aos demais funcionários do laboratório de patologia **Adriano**, **Fabiana**, **Geovania**, **Luana** e **João**;

Aos funcionários do Orocentro, **Sra. Aparecida Conceição Campion**, **Elizabete**, **Jeane** e **Rogério** por toda ajuda às terças-feiras.

Por fim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“Quando você se lança numa jornada e o fim parece cada vez mais distante, então você percebe que o verdadeiro fim é o percurso”.

Emile Dark

O comprometimento ósseo em pacientes com câncer é responsável por significativas morbidade e redução da qualidade de vida, principalmente quando se trata de câncer de mama, no qual o esqueleto é o principal sítio de desenvolvimento das metástases. Bisfosfonatos (BPs) contendo ou não nitrogênio são os principais agentes usados no combate à perda óssea como na osteoporose, uma vez que induzem apoptose de osteoclastos. Recentemente foram demonstradas ações antitumoral e antiangiogência dos BPs, *in vitro* e *in vivo*. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi analisar e comparar os efeitos antitumorais e antiangiogênicos de BP que não contém nitrogênio (clodronato, CLO) e BP contendo nitrogênio (ácido zoledrônico, ZOL), em linhagem celular derivada de câncer de mama, MCF-7, e em culturas de células endoteliais. Os resultados mostram que ZOL reduziu a proliferação das MCF-7 de maneira dose-dependente, com aumento do número de células nas fases G0/G1, sem alterar a viabilidade. Paralelamente, CLO não mostrou nenhum efeito sobre as células tumorais. O tratamento de células endoteliais de coelho, RAEC, com ZOL ou CLO reduziu a proliferação celular derivada, sem alterar sua viabilidade. Células endoteliais humanas HUVEC mostraram 15% de redução da viabilidade quando tratadas com ZOL, enquanto CLO não mostrou efeitos citotóxicos. A incubação de células HUVEC com meio condicionado por células MCF-7 tratadas com ZOL culminou na redução da proliferação das células endoteliais e na redução da

formação de estruturas semelhantes a vasos, *in vitro*. Esse mesmo meio condicionado pelas células tumorais tratadas com ZOL resultou em menor proliferação de células provenientes de aorta murina, em ensaio *ex vivo*. Ensaio de imunoabsorção revelaram diminuição nos níveis de VEGFA total nesse meio condicionado, assim como aumento da quantidade da isoforma antiangiogênica VEGFA_{165b}, após tratamento das MCF-7 com ZOL. Por último, o tratamento das células MCF-7 com ZOL modulou a expressão de VEGFA total e de suas isoformas. Em conjunto, estes achados mostram que ZOL exibe ação antitumoral e antiangiogênica em células de câncer de mama e em células endoteliais. Tais dados contribuem para um maior esclarecimento sobre os mecanismos de ação dos BPs, permitindo buscas por melhorias no uso desses agentes como coadjuvantes na quimioterapia, a fim de minimizar a morbidade decorrente de metástases ósseas em tumores malignos.

Palavras-chave: angiogênese / bisfosfonatos / câncer de mama / clodronato / MCF-7 / ácido zoledrônico

ABSTRACT

Patients with cancer frequently develop bone metastasis, resulting in considerable morbidity and affecting quality of life. This is particularly important considering breast cancer, in which skeletal is the main site for metastasis. Non-nitrogen-containing and nitrogen-containing bisphosphonates (BPs) are the mainly agents to treat bone loss due to osteoporosis, Paget disease, bone metastasis, multiple myeloma, hypercalcemia and *osteogenesis imperfecta*. BPs impair bone loss by inducing apoptosis in osteoclasts. Recently it was shown anti-tumoral and anti-angiogenic effects of BPs, *in vitro* and *in vivo*. The present study aim to analyze and compare the anti-angiogenic pathway of the non-nitrogen-containing BP, clodronate (CLO), and the nitrogen-containing BP, zoledronic acid (ZOL), using estrogen receptor-positive breast cancer cell line, MCF-7, and endothelial cells. ZOL treatment reduced MCF-7 cell proliferation and induced cell cycle arrest in a dose-dependent manner, while CLO did not affect these cells. Treatment with ZOL or CLO also reduced RAEC cells proliferation, without changes in cell viability. HUVEC cells showed reduced viability after incubation with ZOL, but not with CLO. The conditioned medium by MCF-7 ZOL-treated cells reduced the formation of blood vessels *in vitro* and proliferation of HUVEC cells, together with lower endothelial cells proliferation derived from mouse aortic rings. Enzyme-linked immunoabsorbent assay showed reduction of ~25% in VEGFA levels, and increased amount of VEGFA_{165b} isoform in the conditioned medium by ZOL-treated

MCF-7 cells. The nitrogen-containing BP also modulated the expression of mRNAs for VEGF in MCF-7 treated cells. In all assays, CLO showed less anti-angiogenic properties when compared with ZOL. Data provided from this study amplify the knowledge of BPs actions, contributing for new approaches of bone metastases in malignant tumors.

Key words: angiogenesis / bisphosphonates / breast cancer / clodronate / MCF-7 / zoledronic acid

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American type culture collection*

ATP: Trifosfato de adenosina

BP: Bisfosfonato

CLO: Clodronato

cDNA: DNA complementar

dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF: *Epidermal growth factor*

EPCs: Precursores endoteliais circulantes

Flt-1: *Fms-like tyrosine kinase 1*

FCS: *Fetal calf serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: *Fibroblast growth factor*

GTP: Guanosina trifosfato

HIF-1: *Hypoxia-inducible factor*

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells*

IGF-1: *Insulin-like growth factor*

IL: Interleucina

INCA: Instituto Nacional de Câncer

kDa: *Kilodalton*

KDR/Flk-1: *Kinase insert domain-containing receptor/fms-like tyrosine kinase 1*

MCF-7: *Michigan cancer foundation - 7*

MEC: Matriz Extracelular

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

mRNA: RNA mensageiro

NF- κ B: *Nuclear factor kappa B*

NRP: Neutropilina

ONM: Osteonecrose nos maxilares

pb: Pares de bases

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PLGF: *Placental growth factor*

PPI: Pirofosfato inorgânico

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*

RAEC: *Rabbit aortic endothelial cells*

RANKL: Ligante do receptor NF- κ B

RT-PCR: *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SDS: *Sodium dodecyl sulphate*

SFB: Soro fetal bovino

SRE: *Skeletal-related events*

TGF: *Tumor growth factor*

TNF: *Tumor necrosis factor*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*

VHL: *von Hippel Lindau*

xg: Força centrífuga

ZOL: Ácido zoledrônico

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Bisfosfonatos (BPs).....	3
2.2. Câncer e metástases ósseas.....	8
2.2.1. Câncer de mama.....	10
2.3. Angiogênese.....	14
2.3.1. Angiogênese tumoral.....	19
2.3.2. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).....	23
2.4. Bisfosfonatos e angiogênese.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Cultura de células.....	33
4.2. Preparo das soluções de clodronato (CLO) e ácido zoledrônico (ZOL)	35
4.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	35
4.4. Citometria de fluxo.....	36
4.5. Curvas de proliferação.....	37
4.6. Ensaio de proliferação de células endoteliais em meio condicionado pelas células MCF-7.....	37
4.7. Modelo animal para estudo da angiogênese.....	38
4.7.1. Proliferação de células endoteliais a partir de aortas murinas.....	38

4.8. Ensaio <i>in vitro</i> de formação de estruturas semelhantes a vasos.....	40
4.9. Ensaio de imunoabsorbância (ELISA).....	40
5.0. Expressão das isoformas de VEGFA.....	41
5.1. Purificação de RNA e RT-PCR quantitativa.....	41
5.2. Expressão de VEGFA e de suas isoformas.....	44
6.0. Forma de análise dos resultados.....	44
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO I: Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	95

1. INTRODUÇÃO

Já se passaram quase 40 anos desde a descoberta dos efeitos biológicos dos bisfosfonatos (BPs) sobre o metabolismo do cálcio. BPs são análogos estáveis do pirofosfato inorgânico e possuem alta afinidade pela matriz óssea mineral, onde se ligam fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea, especialmente em locais onde há intensa remodelação tecidual ([Russel & Rogers, 1999](#)). Clinicamente os BPs são usados no combate à inibição da reabsorção óssea, sendo tratamento de escolha para uma variedade de patologias onde há atividade osteoclástica excessiva, tais como doença óssea de Paget, osteoporose e doença óssea metastática osteolítica ([Wyngaert et al., 2009](#)). Atualmente estão bem estabelecidos os efeitos benéficos dos BPs em complicações ósseas associadas a malignidades, com hipercalcemia, dor, destruição óssea e fraturas patológicas, possibilitando aumento da sobrevida e redução da morbidade dos pacientes ([Coleman & McCloskey, 2011](#); [Russell, 2011](#)).

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. No Brasil, as taxas de mortalidades são elevadas devido ao diagnóstico tardio e a complicações dos estágios avançados da doença ([INCA, 2010](#)). Esta neoplasia está entre as que mais causam metástases ósseas, sendo que 90% ou mais dos pacientes com câncer de mama avançado desenvolvem lesões no esqueleto ([Drake et al., 2008](#)). O surgimento de metástases ósseas é uma importante complicação do câncer de mama devido à

alta morbidade associada à diminuição do prognóstico. Portanto, o entendimento dos eventos celulares envolvidos no desenvolvimento da doença óssea metastática, assim como a elaboração de estratégias terapêuticas para prevenção de novas metástases e inibição do crescimento daquelas já existentes são importantes objetivos terapêuticos para o câncer de mama ([Clines & Guise, 2004](#)).

A angiogênese é um processo essencial durante o crescimento normal dos tecidos e a cicatrização, sendo caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos, seja a partir de vasos pré-existentes ou pelo recrutamento de células endoteliais progenitoras da medula óssea ([Carmeliet et al., 2001](#)). Paralelamente, a formação de vasos sanguíneos também desempenha papel fundamental no desenvolvimento, progressão e formação de metástases em neoplasias malignas, uma vez que um suprimento sanguíneo adequado se faz necessário para garantir o fornecimento de oxigênio e nutrientes às células tumorais ([Folkman et al., 1971](#)).

Recentemente foram demonstradas ações antitumoral e antiangiogênia dos BPs, uma vez que estes agentes inibem a proliferação tanto de células tumorais quanto endoteliais, além de reduzir a formação de vasos sanguíneos em ensaios *in vitro* e *in vivo* ([Fournier et al., 2002](#); [Walter et al., 2011](#)). No presente trabalho, analisamos os mecanismos antiangiogênicos de BPs em linhagem celular derivada de câncer de mama e em células endoteliais. Para isto foram realizados ensaios de proliferação, viabilidade celular, cultura primária de anéis de aorta murina, ensaios tridimensionais para a formação de estruturas vasculares e análise da expressão dos mRNAs de VEGFA total e de suas isoformas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bisfosfonatos (BPs)

Apesar de serem conhecidos há mais de 4 décadas, atualmente os bisfosfonatos (BPs) compõem a classe mais importante de agentes usados no combate à perda óssea decorrente de osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas, mieloma múltiplo, hipercalcemia, além de outras doenças, como a osteogênese imperfeita (Roelofs *et al.*, 2006; Drake *et al.*, 2008).

Os BPs foram sintetizados por von Baeyer e Hofmann, em 1865, e utilizados inicialmente como agentes anticorrosivos, uma vez que inibem a precipitação de sais de cálcio (Fleisch, 2002). Estes agentes são derivados estáveis do pirofosfato inorgânico (PPi), um composto natural, no qual dois grupos fosfato são ligados por esterificação, sendo resistentes à hidrólise (Russell *et al.*, 1999). PPi é liberado como um subproduto de diversas reações biossintéticas, sendo possível sua detecção no plasma e na urina, porém é rapidamente hidrolizado (Russell, 2006). PPi é capaz de inibir a calcificação por se ligar a cristais de hidroxiapatita, inibindo a formação e a dissolução dos cristais de fosfato de cálcio (Fleisch *et al.*, 1966). PPi inibe a formação de depósitos de cálcio em cultura de tecidos e inibe a calcificação ectópica *in vivo*, mas falha em influenciar a reabsorção óssea *in vivo*, possivelmente porque ele é hidrolizado antes que atinja o local de ação. Desse modo, analogamente aos PPis, os BPs possuem alta afinidade pela matriz óssea mineral, especialmente em locais onde há intensa

remodelação óssea e acúmulo de cristais de hidroxiapatita. BPs agem não apenas inibindo a calcificação, mas também evitando a quebra da hidroxiapatita, o que resulta em inibição da reabsorção óssea ([Russell et al., 1970](#); [Fleisch, 2007](#)).

Estruturalmente os BPs são formados por 2 grupos fosfato ligados a um átomo central de carbono (P-C-P) e por duas cadeias laterais (R' e R''), unidas ao carbono central (**Figura 1**), as quais permitem um grande número de variações estruturais ([Dannemann et al., 2006](#)). O radical R' faz a ligação ao tecido ósseo, enquanto R'' é responsável pela eficácia e atividade farmacológica dos BPs ([Russell, 2007](#)). Os BPs diferem do PPI por conter um carbono central não hidrolizável no lugar do oxigênio, conferindo grande estabilidade à hidrólise, e praticamente todos os BPs usados atualmente possuem um grupo hidroxil ligado ao carbono central (em R'). Os grupos fosfato conferem afinidade aos cristais de hidroxiapatita, enquanto o grupo hidroxil aumenta sua ligação ao cálcio, dando aos BPs uma alta afinidade pelo tecido ósseo ([Russell, 2007](#)).

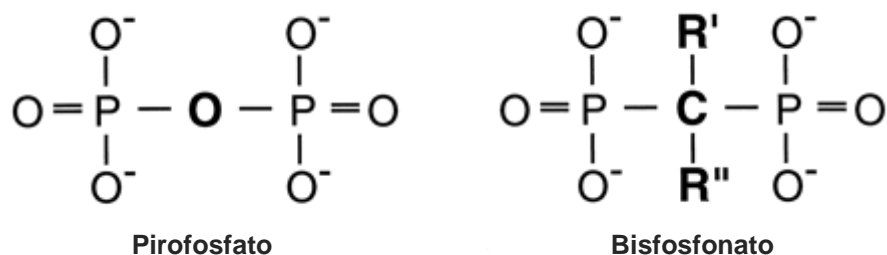


Figura 1: Estrutura química do pirofosfato e dos bisfosfonatos. No carbono central (C) dos bisfosfonatos estão ligados dois grupos fosfato (P) e duas cadeias laterais (R' e R'') (Fleisch, 1998).

Os BPs são divididos em 2 grupos: **BPs que não contêm nitrogênio** e **BPs contendo nitrogênio**, sendo que a presença de um nitrogênio ou grupo amino aumenta de 10 para 10.000 vezes o potencial de inibição da reabsorção óssea em relação aos BPs que não contêm nitrogênio (Russell, 2006). O primeiro grupo consiste na **primeira geração de BPs** e inclui os fármacos etidronato, clodronato (CLO) e tiludronato. Por sua semelhança estrutural com PPI, esses BPs são adicionados nas moléculas recém formadas de ATP pela classe II de RNA amino-acil transfersintases, após serem incorporados por endocitose pelos osteoclastos na matriz óssea mineral (Russell, 2006; Drake *et al.*, 2008). O acúmulo intracelular desses análogos não hidrolisáveis de ATP resulta em citotoxicidade e apoptose de osteoclastos (Drake *et al.*, 2008). Por outro lado, os **BPs de segunda e terceira gerações** (alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato e ácido zoledrônico - ZOL) contêm nitrogênio na cadeia R'' e induzem

apoptose em osteoclastos por um mecanismo distinto. Esses fármacos se ligam e inibem a atividade da pirofosfato farnesil sintase, enzima chave na via do mevalonato, necessária para a produção de colesterol, outros esteróides e lipídeos isoprenóides ([Kavanagh et al., 2006](#)). Desse modo, há inibição de alterações pós-traducionais essenciais para a atividade osteoclástica, tais como a isoprenilação de proteínas ligadoras de GTP, Rab, Rac e Rho, resultando em apoptose ([Luckman & Hughes, 1998](#)).

Não é possível mensurar clinicamente a apoptose de osteoclastos induzida por BPs, mas pode-se verificar redução de marcadores de reabsorção óssea, tais como os produtos finais da quebra de colágeno tipo I, amino e carboxil-terminais, tanto na urina quanto no plasma ([Drake et al., 2008](#)). A supressão máxima da reabsorção óssea ocorre aproximadamente 3 meses após o início da terapia oral com BPs, permanecendo relativamente constante durante todo o tratamento ([Cremers et al., 2005](#)). A administração endovenosa se mostra mais eficaz em bloquear a reabsorção óssea do que a via oral ([Drake et al., 2008](#)).

BPs são moléculas hidrofílicas, pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal após administração oral (menos de 1%, aproximadamente), e apenas 50% da droga absorvida é retida no tecido ósseo, enquanto o restante é eliminado pela urina, sem que haja sua metabolização ([Russell et al., 1970](#); [Lin, 1996](#)). A retenção óssea dos BPs depende de fatores do hospedeiro (função renal, taxa de *turnover* ósseo) e da eficácia do medicamento ([Cremers et al., 2005](#)). Desse modo, devido à alta afinidade pelo tecido ósseo, onde permanece depositado por anos até que o

tecido seja reabsorvido, poucos efeitos não-ósseos são esperados para os BPs ([Fleisch, 1989](#)).

Os efeitos adversos descritos ao uso de BPs são: (a) maior incidência de fibrilação atrial, (b) redução do *turnover* ósseo e consequentes fraturas patológicas, (c) hipocalcemia, (d) resposta inflamatória aguda nas administrações iniciais de BPs contendo nitrogênio e mais raramente, inflamação ocular, (e) dores musculares, (f), irritação e erosão esofágicas, e (g) insuficiência renal (revisado por [Drake et al., 2008](#)). Talvez o principal efeito colateral associado ao uso dos BPs seja a osteonecrose dos maxilares (ONM), condição clínica relativamente rara, descrita em 2003, na qual os ossos dos maxilares são expostos à cavidade oral devido o uso crônico de BPs ([Carey & Palomo, 2008](#)). A etiopatogenia da ONM não está completamente compreendida. Os possíveis fatores desencadeantes são o tipo de BP, a via de administração, duração do tratamento, procedimentos cirúrgicos orais na vigência do uso de BP, bem como pacientes etilistas, fumantes e com má condição de higiene bucal. Os critérios diagnósticos foram determinados pela *American Association of Oral Maxillofacial Surgeons* ([AAOMS, 2007](#)) e *American Society for Bone and Mineral Research* ([ASBMR, 2007](#)) para padronizar o diagnóstico e a conduta terapêutica e incluem a presença concomitante das 3 seguintes características: **(1)** uso prévio ou corrente de BP, **(2)** osso necrótico exposto em região maxilofacial por, pelo menos 8 semanas, a partir do diagnóstico clínico, e **(3)** ausência de história de radioterapia. Exclui do diagnóstico de ONM situações como úlcera em sítios de exodontia (osteíte alveolar), periodontite necrosante e carcinoma oral. Cerca de 90% das

osteonecroses relatadas na literatura ocorreram em pacientes com câncer em localizações extra-orais, sendo que pacientes com osteoporose ou doença de Paget são menos comumente afetados ([Carey & Palomo, 2008](#)). Essa diferença de proporção é decorrente do fato de que pacientes com câncer recebem cerca de 12x mais BPs endovenosamente e são submetidos a procedimentos cirúrgicos odontológicos após o início da terapia do que pacientes com osteoporose ou doença de Paget. A prevalência de ONM em pacientes utilizando BPs injetáveis mensalmente para o tratamento de metástase óssea varia de 1-10%, enquanto menos de 1 paciente é acometido por ONM por ano, dos 10.000 a 100.000 que fazem uso de BPs orais para osteoporose ([Carey & Palomo, 2008](#); [Drake et al., 2008](#)).

2.2. Câncer e metástases ósseas

Neoplasia maligna ou câncer é uma doença que resulta de múltiplos eventos genéticos, tais como inativação de genes supressores de tumor e/ou ativação de oncogenes ([Crum, 1996](#); [Lewis & Conry, 1997](#)). Estes eventos levam a uma perda do controle do ciclo celular e permitem o acúmulo de erros no DNA das células em divisão. Com o crescimento desordenado, as células tumorais são capazes de invadir os tecidos vizinhos e destacar-se de seu local de origem, proliferando em locais distantes do sítio primário, fenômeno este conhecido como metástase ([Defino et al., 2001](#)). As células de todos os tumores malignos têm potencial de invasão ou de metastatização, mas cada neoplasia possui características clínicas e biológicas específicas ([McPherson et al., 2000](#)).

A invasão de células malignas para o esqueleto ocorre muitas vezes durante os estágios finais do câncer, principalmente em neoplasias oriundas de carcinoma de mama, próstata, pulmão e mieloma múltiplo. Câncer de mama e de próstata em estágios avançados têm alta prevalência de metástases ósseas, cerca de 60-70%, quando comparados com outros sítios ([Guise & Mundy, 1998](#)). As lesões metastáticas podem ser osteolíticas, osteogênicas ou uma combinação de ambas, e complicações como fraturas e dor ósseas fazem da doença óssea metastática uma temida complicação nos pacientes com câncer ([Clines & Guise, 2004](#)).

O termo “**eventos relacionados ao esqueleto**”, ou *skeletal-related events* (SRE), diz respeito às principais complicações do comprometimento ósseo: fraturas patológicas (10 a 20% dos casos), compressão da medula espinhal (10% dos casos) e hipercalcemia (10 a 15% dos casos) ([Body, 2000](#)). Pacientes que têm apenas metástases ósseas apresentam maior taxa de SRE do que pacientes que apresentam metástases ósseas e viscerais, uma vez que os primeiros recebem mais radioterapia ([Plunkett et al., 2000](#)). Desse modo, o comprometimento ósseo em pacientes com câncer é responsável por significativas morbidade e redução da qualidade de vida, principalmente quando se trata de câncer de mama ([Body, 2006](#)). Para esse tipo de câncer, o esqueleto é o principal local de desenvolvimento das metástases e pacientes com metástases ósseas vivem, em média, 2,2 anos, enquanto aqueles com metástases viscerais vivem, em média, 5,5 meses ([Plunkett et al., 2000](#)). Além disso, os gastos com o

tratamento de metástases ósseas são altos e apenas paliativos. Portanto, devido ao papel relevante das metástases ósseas em neoplasias com grande incidência, a compreensão dos eventos celulares envolvidos neste processo, juntamente com a elaboração de estratégias terapêuticas para sua prevenção e/ou contenção são metas importantes para a gestão terapêutica do câncer ([Clines & Guise, 2004](#)).

2.2.1. Câncer de mama

O carcinoma de mama decorre da proliferação maligna de células epiteliais que revestem os ductos ou lóbulos glandulares das mamas. De acordo com a *World Health Organization* ([WHO](#)), a classificação histopatológica se concentra nos três tipos mais frequentes: carcinoma ductal invasivo, ductal *in situ* e lobular invasivo ([WHO, 2003](#)).

Esta neoplasia maligna é considerada uma doença multifatorial, causada por fatores hereditários e ambientais. Acredita-se que 90% a 95% dos casos de câncer de mama sejam esporádicos, decorrentes de mutações somáticas durante a vida. Os demais 5% a 10% são hereditários, decorrentes de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estes indivíduos maior suscetibilidade ao câncer de mama ([Bilimoria & Morrow, 1995](#); [Barros, 2005](#)). Ainda assim, o risco de câncer de mama em parentes de primeiro grau de mulheres com a doença é de aproximadamente 2x maior do que em mulheres da população geral ([Antoniou *et al.*, 2008](#)). Até o presente momento, foram identificados e confirmados 4 genes de alta penetrância (BRCA1, BRCA2, TP53 e PTEN), além de outras variantes de penetrância moderada e baixa, os quais contribuem para o desenvolvimento desta

neoplasia. Ainda assim, estima-se que esses genes representem apenas 28% das causas hereditárias da doença ([Zhang et al., 2011](#)). Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, responsáveis pela integridade do genoma e manutenção da estabilidade cromossômica, representam cerca de 16% dos casos de câncer de mama hereditário. Portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, além de terem o risco aumentado para câncer de mama, são mais susceptíveis a câncer de ovário, colo uterino e pâncreas, bem como de melanoma ([Groep et al., 2011](#)).

Apesar da rara ocorrência, o câncer de mama também acomete homens, com uma incidência de cerca de 0,5-1% quando comparado com as mulheres. ([Giordano et al., 2004](#)). Para os homens, a taxa de sobrevivência é pior e menor, devido a fatores como diagnóstico tardio, idade avançada no momento do diagnóstico e falta de tratamento padronizado. Além disso, o foco de prevenção tem como público alvo as mulheres, com incentivos de campanhas de prevenção, uso de terapia de reposição hormonal e exames de mamografia ([Miao et al., 2011](#)).

Como o câncer de mama é uma doença dependente de hormônios, os fatores de risco associados ao seu desenvolvimento estão relacionados à vida reprodutiva da mulher, tais como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, menopausa tardia, terapia de reposição hormonal e história familiar ([INCA, 2010](#)). Além desses, há certa correlação entre o aumento do risco de câncer de mama com fatores ambientais e estilo de vida da paciente, a partir de uma dieta rica em gorduras, sobrepeso e uso excessivo de álcool ([McPherson et al., 2000](#)). Para os hormônios exógenos, há

aumento do risco de desenvolvimento do tumor nos casos de terapia de reposição hormonal após menopausa. Por outro lado, a baixa taxa hormonal presente em contraceptivos orais praticamente não aumenta o risco de câncer de mama ([Harrison, 2008](#); [McPherson et al., 2000](#)).

Existem múltiplas formas de apresentação clínica e morfológica do câncer de mama, com diferentes graus de agressividade e potencial metastático, os quais determinam a forma de tratamento ([Silva et al., 2002](#)). O principal tratamento para o câncer de mama é a cirurgia, principalmente quando o tumor é localizado, seguido de quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal adjuvante com tamoxifeno ou inibidores da aromatase. ([Polgár & Major, 2009](#); [Elston & Ellis, 1991](#)).

Apesar de ser considerado um câncer com prognóstico relativamente bom se diagnosticado e tratado oportunamente, dados do Instituto Nacional de Câncer ([INCA, 2010](#)) revelam que o câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. A estimativa para 2010 foi 49.240 novos casos no Brasil. As taxas de mortalidade, no entanto, continuam altas e em 2008 o número de mortes foi de 11.860, sendo 11.735 mulheres e 125 homens, com sobrevida média mundial em 5 anos de 61% ([INCA, 2010](#)). Além disso, como citado anteriormente, o câncer de mama é um dos tumores que mais causam metástases ósseas ([American Institution for Cancer Research, 2007](#)). Os mecanismos de predileção das células de tumor de mama por tecido ósseo não foram totalmente compreendidos. Fatores quimiotáticos liberados durante o *turnover* ósseo podem atrair as células tumorais, mas o

principal mecanismo aceito é o de “**sementes e solo**”, no qual as células tumorais (sementes) secretam fatores como a proteína relacionada ao paratormônio, potencializando o surgimento de metástases no tecido ósseo, que consiste em um “solo” fértil, rico em citocinas e fatores de crescimento, que estimulam a proliferação das células tumorais. Ao mesmo tempo, a liberação de proteína relacionada ao paratormônio e fatores osteolíticos pelas células tumorais estimulam a reabsorção óssea ([Body, 2006](#)).

No câncer de mama há uma inversão na relação osteoprotegerina, inibidora da osteoclastogênese, cuja produção diminui, e do ligante do receptor NF- κ B (RANKL), cuja produção aumenta ([Hofbauer, 1999](#)). Essa inversão culmina em aumento da proliferação e da atividade de osteoclastos que, por sua vez, resulta em osteólise local e proliferação das células tumorais ([Käkönen & Mundy, 2003](#); [Mundy, 2003](#)).

Clinicamente o uso de BPs tem sido benéfico para o tratamento dos SRE. Vários estudos vêm confirmando as vantagens do tratamento adjuvante dessas drogas na redução do risco de recorrência de lesões ósseas e no aumento da sobrevida global de pacientes com câncer de mama ([Theriault, 2010](#)). Dados pré-clínicos e clínicos indicam que os BPs afetam negativamente vários processos que suportam o crescimento tumoral, proliferação e formação de metástases ([Yan *et al.*, 2012](#)). Previamente foi demonstrado que a administração endovenosa dos BPs pamidronato, ZOL ou ibandronato promoveu melhorias significativas em relação à dor e a complicações ósseas em pacientes com metástases ósseas decorrentes

de câncer de mama (revisado por [Drake et al., 2008](#)). Embora o mecanismo exato ainda não tenha sido elucidado, a adição de ZOL como adjuvante na terapia padrão pode melhorar o prognóstico e diminuir o risco da progressão do câncer de mama, principalmente em pacientes na pós-menopausa ([Aft, 2011](#); [Yan et al., 2012](#)). A combinação de ZOL com Bevacizumab, anticorpo monoclonal humano que bloqueia especificamente a ligação de VEGF (*ver item 2.3.2 adiante*) a receptores de alta afinidade, têm sido amplamente investigado ([Aapro & Coleman, 2011](#); [Guarnei et al., 2010](#); [Ngamphaiboon et al., 2011](#)). Entretanto, a *Food and Drug Administration* (FDA) decidiu recentemente revogar a aprovação do Bevacizumab, concedida em 2008, devido a dados que confirmaram falha na progressão da sobrevivência dos pacientes e efeitos colaterais tóxicos, resultando em baixa relação custo/benefício. Mesmo assim, Bevacizumab continua liberado para o tratamento de outros tipos de câncer, tais como carcinoma colorretal, glioblastoma multiforme recorrente, carcinoma de células renais, câncer de pulmão metastático de células não pequenas e de células escamosas ([Carey, 2012](#)).

2.3. Angiogênese

A neovascularização ou formação de novos vasos ocorre através de dois processos: **vasculogênese** e **angiogênese (Figura 2)**. A **vasculogênese** ocorre a partir da diferenciação de células endoteliais precursoras (angioblastos), que proliferam, migram e se diferenciam em células endoteliais, as quais são responsáveis pela formação de artérias, veias e vasos linfáticos ([Fischer et al.,](#)

2006) Por outro lado, a **angiogênese** é o processo de formação de novos vasos em tecidos adultos, nos quais novos capilares são formados a partir da extensão e ramificação de vasos pré-existentes ou pelo recrutamento de células endoteliais progenitoras da medula óssea (Risau & Flamme, 1995; Risau, 1997; Carmeliet, 2000; Kurz *et al.*, 2003). Existe ainda um terceiro processo de formação de vasos sanguíneos chamado **arteriogênese**, o qual se caracteriza pelo remodelamento estrutural de vasos colaterais pré-existentes, dirigido em parte, por estresse vascular (revisado por Ucuizian *et al.*, 2007).

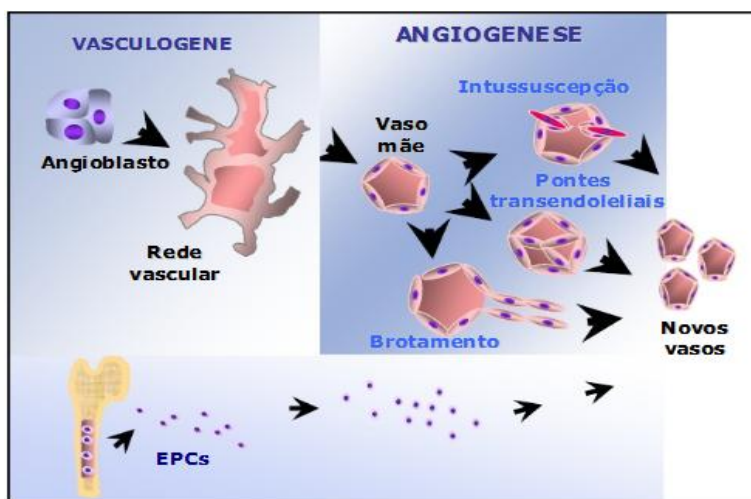


Figura 2: Tipos de neovascularização: vasculogênese e angiogênese, sendo esta dividida em: brotamento, intussuscepção, pontes transendoteliais e recrutamento de precursores endoteliais circulantes (EPCs) da medula óssea (Modificado de Carmeliet, P. (2003) *Nat Med* 6(4), 389-395 por Mônica A.N.D. Ferreira).

A **angiogênese** é um processo complexo e que envolve a interação de células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (MEC). Trata-se de uma etapa fundamental nos processos de crescimento tecidual fisiológico, processos inflamatórios e cicatriciais, além de ser um evento indispensável para o crescimento tumoral e metástases ([Lieken et al., 2001](#)). Apesar de ser rigorosamente controlada, desregulações no processo de angiogênese podem levar ao desenvolvimento de diversas doenças, como artrite reumatóide, retinopatias vasculares, entre outras. Além disso, a angiogênese tumoral tem sido objeto de diversos estudos nos últimos anos, em busca de maior compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na patogênese tumoral e dos efeitos terapêuticos dos agentes antiangiogênicos.

A formação de um novo vaso requer várias etapas (**Figura 3**): (i) liberação de proteases por células endoteliais ativadas, (ii) ligação desses fatores angiogênicos a receptores específicos na membrana basal, a qual sofre degradação, (iii) invasão e migração das células endoteliais para o espaço intersticial, (iv) proliferação e, por fim, (v) diferenciação em vasos sanguíneos maduros. Estes processos são mediados pela participação de vários indutores da angiogênese, incluindo fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas angiogênicas, receptores endoteliais específicos e moléculas de adesão ([Mignatti & Rifkin, 1996](#)). Após a degradação proteolítica da MEC, as células endoteliais começam a migrar através da matriz degradada e a proliferar, estimuladas por uma variedade de fatores de crescimento, alguns dos quais são liberados pela própria MEC degradada.

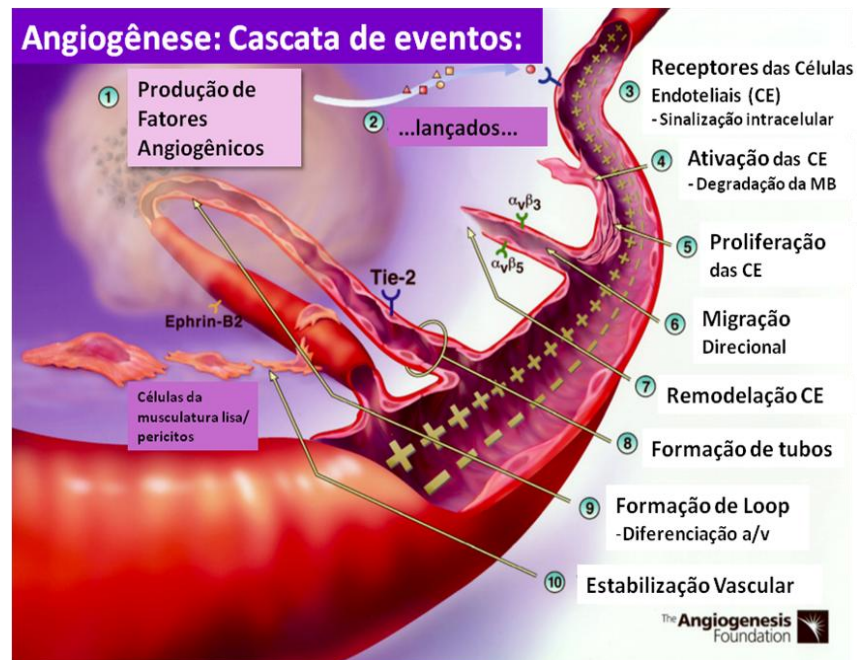


Figura 3: Etapas do processo de angiogênese: Por estímulo tumoral ou tecido lesionado, fatores angiogênicos são liberados (1), difundidos por tecidos proximais, onde se ligam a receptores específicos (2). As células endoteliais (CE) são ativadas (3) e produzem enzimas que degradam a membrana basal de vasos sanguíneos preexistentes (4). As CE se proliferam e iniciam a formação de brotos em direção ao tecido de estímulo (5), onde moléculas especializadas na adesão (integrinas) servem como gancho na migração dos brotamentos (6). Enzimas adicionais (metaloproteinases da matriz) auxiliam na remodelação desses brotos (7), os quais se fecham para formação dos tubos (8), que se unem para formar *loops* dos vasos sanguíneos (9). Finalmente, os vasos recém-formados são estabilizados por células musculares especializadas lisas, os pericitos, que fornecem suporte estrutural para o fluxo sanguíneos (10) (Modificada de *The Angiogenesis Foundation* (2011) <http://www.angio.org/understanding/process.php>).

Existe uma variedade de fatores indutores de angiogênese, os quais são divididos em três classes (Klagsbrun & Moses, 1999). A **primeira classe** consiste na família do fator de crescimento epitelial vascular – VEGF, fundamental neste processo, já que o crescimento dos vasos sanguíneos depende da sua produção e secreção, estimulada pela redução dos níveis de oxigênio e pelas angiopoietinas, as quais agem especificamente nas células endoteliais, modulando as interações celulares e promovendo a diferenciação celular (Ferrara *et al.*, 2002). A **segunda classe** inclui principalmente moléculas de ação direta, como citocinas, quimiocinas e enzimas angiogênicas, que ativam uma ampla variedade de células-alvo e as próprias células endoteliais. Um importante membro deste grupo é o fator de crescimento fibroblástico do tipo 2 ou básico (FGF-2), um dos primeiros peptídeos angiogênicos a ser caracterizado (Moore *et al.*, 1998; Brown & Bicknell, 1998; Chiarugi *et al.*, 1998). O **terceiro grupo** de moléculas angiogênicas são os fatores de ação indireta, cujo efeito resulta na liberação de fatores de ação direta por macrófagos, células endoteliais e células tumorais. Destes, os mais estudados são fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), que são capazes de induzir a angiogênese pelo aumento da expressão de FGF-2, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF e seus receptores, além da interleucina (IL)-8 (Falcone *et al.*, 1993; Pintavorn & Ballermann, 1997; Giraudo *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1997). Uma vez que a neovascularização se faz suficiente, ocorre diminuição da regulação dos fatores pró-angiogênicos e/ou aumento da concentração local de inibidores da angiogênese. Como resultado, as células endoteliais se tornam quiescentes e os

vasos podem permanecer no local ou podem regredir, caso não sejam mais necessários.

2.3.1. Angiogênese tumoral

J. Folkman e colaboradores (1971) estabeleceram o conceito de que o desenvolvimento de um tumor é dependente de angiogênese, ou seja, para que um tumor cresça além de certo tamanho, se faz necessário um suprimento sanguíneo adequado, capaz de garantir o fornecimento de oxigênio e nutrientes às células tumorais. Sendo assim, o crescimento tumoral é governado pela capacidade de difusão de oxigênio fornecida pelos vasos sanguíneos da região, a qual é de aproximadamente 100-200 μm (Hanahan & Folkman, 1996; Folkman *et al.*, 2000), e os tumores não conseguem ter mais do que 1 ou 2 mm de diâmetro, a menos que sejam vascularizados (Folkman, 2002). Assim como em tecidos normais, a angiogênese tumoral pode ocorrer pela mobilização de células precursoras ou pelo desenvolvimento dos capilares já existentes (Carmeliet *et al.*, 2001) no entanto, os vasos sanguíneos formados diferem dos vasos normais por serem tortuosos, irregulares e menos permeáveis (Jain, 2003; McDonald *et al.*, 2003).

As células tumorais são geneticamente instáveis, apresentam variadas mutações, altos índices de proliferação e tendência a produzir oncogenes. Os tumores malignos possuem variados fenótipos, incluindo angiogênicos. Em fases iniciais do crescimento das neoplasias malignas não há estímulo da angiogênese, podendo os tumores permanecer “dormentes” por meses ou anos, até que

algumas de suas células tumorais adquiram um fenótipo angiogênico (revisado por [Bergers & Benjamin, 2003](#)). A mudança para o fenótipo angiogênico depende do equilíbrio entre fatores pró ou antiangiogênicos. As células tumorais induzem a produção de fatores angiogênicos através dos seguintes eventos: (i) adquirindo um fenótipo angiogênico; (ii) pela ativação de células do estroma, como fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, recrutados no tecido adjacente ou de tecidos não-tumorais de locais mais distantes; (iii) pela liberação de fatores angiogênicos da MEC a qual estão ligados; e (iv) expressão de novos epítomos na MEC que promovem angiogênese. Paralelamente, células não tumorais secretam fatores pró-angiogênicos, permitindo sua interação com as células neoplásicas e com a MEC alterada ([Norrby et al., 2006](#)).

O fator de crescimento endotelial vascular, VEGF (VEGFA, particularmente VEGFA_{165/164} – *ver adiante*), é o principal fator pró-angiogênico da maioria dos tumores humanos. Células sob situação de hipóxia, decorrente da intensa proliferação celular e do metabolismo celular aumentado, produzem VEGF e estimulam aumento da expressão de seus receptores nas células endoteliais pré-existentes. As principais funções do VEGF são promover a sobrevivência das células endoteliais, induzir a proliferação destas células e promover a migração e invasão da MEC ([Norby et al., 2006](#)).

Os produtos das células tumorais que influenciam a angiogênese são ativos não somente no tumor, mas também em tecidos distantes ([Norrby et al., 2006](#)). Um exemplo deste tipo de efeito “distal” é o recrutamento dos precursores endoteliais circulantes (EPCs) da medula óssea pelo VEGF secretado pelas

células tumorais. EPCs são capazes de se fixarem em microvasos angiogenicamente ativados no tumor e aumentar a reação angiogênica através de sinalização parácrina (Kinnaird *et al.*, 2004) ou por funcionarem como células suporte para o desenvolvimento de novos vasos (Ziegelhoeffer *et al.*, 2004).

A ideia de que a angiogênese é um alvo em potencial para a terapia tumoral, é amplamente aceita. Vários agentes antiangiogênicos que inibem tanto fatores de crescimento angiogênicos quanto seus receptores já foram desenvolvidos e têm sido objeto de diversos experimentos pré-clínicos e clínicos (Papetti & Herman, 2002). O primeiro inibidor angiogênico descrito foi a trombospondina-1, que modula a proliferação de células endoteliais e sua mobilidade (Volpert *et al.*, 1995). Curiosamente muitas moléculas inibitórias, tais como as "estatinas", são derivadas de proteínas maiores que não têm efeito sobre a angiogênese. Entre elas estão a angiostatina (um fragmento do plasminogênio que liga a anexina II e a ATP sintase), endostatina, tumstatina e canstatina, os quais são fragmentos de colágenos que se ligam a integrinas (revisado por Kalluri *et al.*, 2002; O'Reily *et al.*, 1997a; O'Reily *et al.*, 1997b; Maeshima *et al.*, 2001). Além destas, diversas moléculas são descritas por interferir nas diferentes etapas do processo de angiogênese, tais como inibição da invasão celular (Marimastat[®], Neovastat[®], AG-3340), adesão (Vitaxin[®]) ou proliferação endotelial (TNP-470, Thalidomide, Combretastatin A-4) (Liekens *et al.*, 2001).

Outro grupo de inibidores da angiogênese é formado por drogas antagonistas ao VEGF ou ao receptor VEGFR-2 (*ver adiante*), sendo que o tratamento com estes inibidores prolonga a sobrevida dos pacientes com câncer.

Um exemplo mencionado anteriormente é o anticorpo contra VEGF, Bevacizumab (Avastin®). Além disso, existem drogas antagonistas a VEGFR-2 já aprovadas para uso clínico, como o Sorafenib (Nexavar®) para carcinoma renal metastático e carcinoma hepatocelular irresssecável, e Sunitinib (Sutent®) e Pazopanib (Votrient®) para carcinoma renal metastático e de pâncreas. Recentemente, Vandetanib (Zactima®) foi aprovado para o câncer inoperável ou com metástase medular da tireóide (revisado por [Carmeliet & Jain, 2011a](#)).

Estudos recentes demonstram que o tratamento com bloqueadores de VEGF ou de seus receptores leva a “normalização” da vasculatura tumoral, através da maturação de vasos, tornando-os menos tortuosos e mais permeáveis, reduzindo a pressão do fluido intersticial, aumentando a oxigenação e a perfusão e, conseqüentemente, a penetração de drogas no tumor ([Tong et al., 2004](#); [Kamoun et al., 2009](#); [Dickson et al., 2007](#); [Taylor et al., 2010](#)). Entretanto, apesar de promissoras, as terapias antiangiogênicas que visam danificar a vasculatura tumoral e inibir a angiogênese parecem ser de curta duração e desenvolver resistência em alguns pacientes ([Ebos et al., 2009](#); [Ribatti et al., 2010](#)). [Carmeliet e Jain \(2011b\)](#) sugerem benefício transiente no tratamento com inibidores de VEGF, que ocorre durante a normalização da vasculatura. Conseqüentemente, o uso prolongado destes agentes reduz os vasos tumorais, porém, paralelamente, as células tumorais ativam uma via angiogênica alternativa. Mesmo assim, esse período de normalização vascular é benéfico para a terapia contra o câncer, uma vez que tumores oxigenados são mais sensíveis à radioterapia e os vasos

funcionantes são mais efetivos para levar quimioterápicos para o interior dos tumores (Carmeliet & Jain, 2011b).

2.3.2. Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)

O controle molecular do processo de angiogênese é complexo e centralizado no fator **VEGF** (Ferrara *et al.*, 2002), promovendo o crescimento das células endoteliais derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). O crescimento dos vasos sanguíneos para responder às necessidades do tecido depende da produção e secreção de VEGF, que é estimulada pela falta de oxigênio. Estudos anteriores têm demonstrado que a transformação oncogênica com ativação dos genes *Src*, *Kas* e *Raf 1*, juntamente com a perda da expressão do gene supressor de tumor *p53*, podem aumentar a expressão de VEGF, sugerindo uma co-ligação entre tumorigênese e angiogênese (Mukhopadhyay *et al.*, 1995).

VEGF é um termo que representa uma família de 7 membros formada por PLGF (*placental growth factor*), VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e VEGFF. VEGFA é o principal regulador do crescimento dos vasos sanguíneos, enquanto que VEGFC e VEGFD regulam a linfangiogênese (Karkkainen *et al.*, 2002). Além de ser mitógeno para células endoteliais, VEGFA também tem importante efeito sobre a permeabilidade vascular e quimiotaxia de monócitos, células derivadas da medula óssea (Clauss *et al.*, 1990). Este fator se liga aos receptores VEGFR-1 ou VEGFR-2 e aos co-receptores neuropilinas 1 e 2 (NRP1 e NRP2), ao passo que VEGFC e VEGFD se ligam a VEGFR-3 no processo de

linfangiogênese ([Karkkainen et al., 2002](#)). Existem muitas evidências de que VEGFR-2 é o mais importante mediador da mitogênese e sobrevivência das células endoteliais, bem como da permeabilidade vascular durante a angiogênese. Em contraste, VEGFR-1 não participa de sinais mitogênicos e pode, especialmente durante o desenvolvimento embrionário, inibir a proliferação endotelial através do sequestro de VEGFA, que por sua vez impede que este fator se ligue a VEGFR-2 ([Ferrara et al., 2003](#)). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos em células endoteliais vasculares e células tumorais, enquanto VEGFR-3 é aparentemente produzido apenas por células endoteliais linfáticas ([Kowanetz & Ferrara, 2006](#)).

Na hipóxia ou em resposta aos fatores TGF- α , TGF- β e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) ocorre um aumento intracelular de fator I induzido por hipóxia (HIF-1 α), que por sua vez estimula a transcrição do gene que codifica VEGFA, cujo produto protéico difunde-se pelos tecidos e atua sobre seus receptores presentes na superfície das células endoteliais. Após o restabelecimento da oxigenação, HIF-1 α torna-se indisponível através de sua contínua degradação proteossômica dependente do produto do gene *von Hippel-Lindau* (VHL) ([Yancopoulos et al., 2000](#)). Como resultado, as células endoteliais tornam-se quiescentes e os vasos permanecem ou regridem se não forem mais necessários. HIF1- α foi identificado inicialmente por responder prontamente a baixas concentrações de oxigênio, entretanto existem evidências de que este fator possa ser regulado pela ativação de oncogenes ou perda de supressores tumorais (revisado por [Denko, 2008](#)). Por exemplo, há acúmulo de HIF-1 α nas células tumorais em resposta a ativação de oncogenes como Ras, SRC e fosfatidilinositol

3-quinase (PI3K), ou perda de supressores tumorais, como PTEN e VHL, mesmo sob condições de normóxia (Bárdos *et al.*, 2004).

O gene humano que codifica VEGF reside no cromossomo 6p21.3 e possui 8 éxons (Tischer *et al.*, 1991; Vincenti *et al.*, 1996). Através de *splicing* alternativo, o mRNA de VEGFA produz proteínas variantes com atividade pró-angiogênica como VEGFA₂₀₆, VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₈₃, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₄₈, VEGFA₁₄₅, e VEGFA₁₂₁ (Houck *et al.*, 1991; Ferrara & Davis-Smyth, 1997) ou antiangiogênicas como VEGFA_{189b}, VEGFA_{183b}, VEGFA_{165b}, VEGFA_{145b} e VEGFA_{121b} (Woolard *et al.*, 2004). Os éxons 1 à 5 e 8 estão preservados em todas as variantes, enquanto a utilização ou não dos éxons 6 e 7 resulta nas distintas isoformas (**Figura 4**). Na isoforma VEGF₁₂₁ faltam os éxons 6 e 7 (Ferrara *et al.*, 1997) e na VEGF₁₆₅ o éxon 7 está ausente, ao passo que a variante VEGF₁₄₈ tem a mesma sequência de aminoácidos da VEGF₁₆₅ menos 35 pares de base no final do éxon 7 (Whittle *et al.*, 1999). Os mRNAs da isoforma VEGF₁₈₉ possuem os éxons 6a e 7 (Ferrara *et al.*, 1997), enquanto que os da VEGF₁₈₃ perdem 18 pares de base do éxon 6 (Lei *et al.*, 1998). VEGFA₁₄₅ contém o éxon 6a, mas não o éxon 7 (Poltorak *et al.*, 1997) e as variantes VEGF₂₀₆ são as mais extensas, contendo além de éxons 6 e 7, mais 51 pares de base do íntron 3 (Houck *et al.*, 1991).

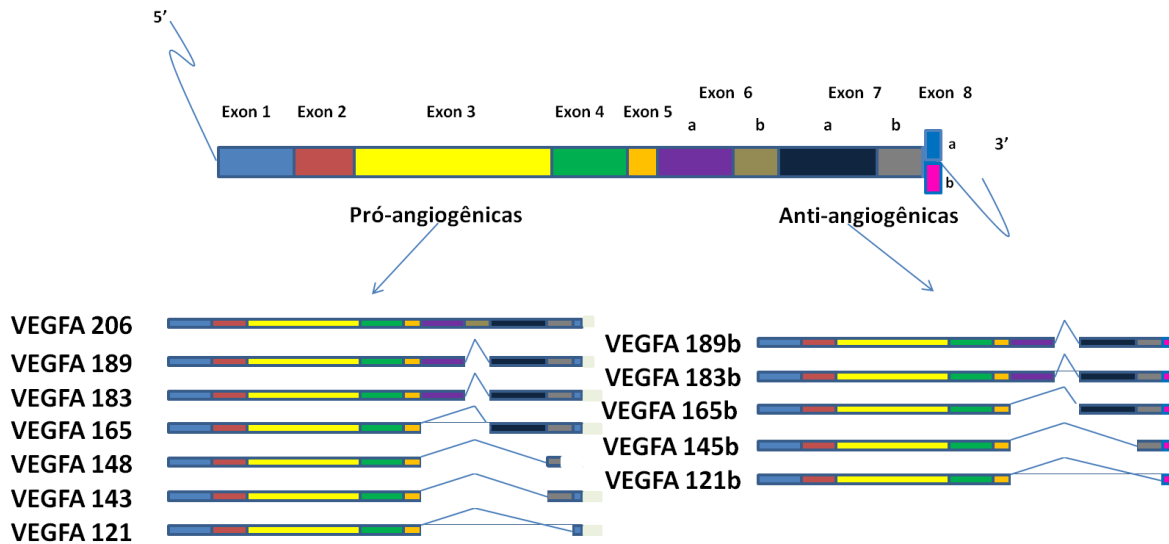


Figura 4: Estrutura dos mRNAs das isoformas de VEGFA. O gene é composto por 8 éxons e o *splicing* alternativo entre os éxons 6, 7 e 8 é capaz de gerar as múltiplas isoformas (Figura cedida por Fabiana Seguin, adaptada de Harper & Bates, 2008).

Ainda não está claro se a diferença no comportamento celular induzido por VEGFA antiangiogênico em comparação com o pró-angiogênico está no tipo de interação com os receptores e consequentes vias de sinalização ou se depende apenas da quantidade de sinal desencadeado (revisado por Harper & Bates, 2008). A maioria das células produtoras de VEGF parece expressar preferencialmente VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₈₉ (Ferrara *et al.*, 2002), dentre as quais as mais estudadas são VEGFA₁₆₅ e VEGFA_{165b}, presentes tanto em tecidos normais quanto em tumores (Rennel *et al.*, 2008). VEGFA_{120/121} é muito

solúvel, pois não se liga a heparina, ao contrário de VEGFA_{165/164}, que se mantém ligada à superfície da célula ou à MEC (Park *et al.*, 1993). VEGFA₁₈₉ e VEGFA₁₈₈ têm maior afinidade à heparina e, portanto, permanecem fortemente associados à superfície celular ou MEC. VEGFA₁₄₅ é uma das principais variantes produzidas por várias linhagens de células derivadas de carcinomas do aparelho reprodutor feminino e de câncer de mama (Poltorak *et al.*, 1997; Stimpfl *et al.*, 2002). VEGFA₁₄₈ foi identificado em glomérulos humanos, mas não há dados relativos da sua expressão em outros tecidos (Whittle *et al.*, 1999). VEGFA₁₈₉ é altamente expresso nos pulmões (Cheung *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2001), enquanto no coração há predomínio da expressão de VEGFA₁₈₉ e VEGFA₁₆₅ (Carmeliet *et al.*, 1999). VEGFA₂₀₆ é uma isoforma rara, descrita em fígado fetal humano (Neufeld *et al.*, 1999). Entretanto, todas estas isoformas se ligam aos receptores VEGFR-1 (também conhecido como Flt-1) e VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (Waltenberger *et al.*, 1994; Carmeliet *et al.*, 1999), sendo a interação com o último reforçada por NRP-1 (Soker *et al.*, 1998). O balanço da expressão destas isoformas parece ser importante tanto na angiogênese fisiológica quanto patológica.

VEGF tem expressão elevada na maioria dos tumores humanos (Ferrara *et al.*, 1997), incluindo o câncer de mama, sendo que o crescimento dessas células tumorais tem sido associado com aumento da produção de VEGF induzido pelo tumor (Bossung & Harbeeck, 2010). Níveis séricos elevados de VEGF apresentam correlação negativa com a sobrevida de pacientes com câncer de mama e outras neoplasias malignas avançadas, fazendo deste um fator de progressão e sobrevivência tumoral (Ferrara *et al.*, 2002; Lipton *et al.*, 2008). E, apesar da alta

expressão de VEGF em tumores malignos, a expressão de cada isoforma é variável. Por exemplo, em câncer de mama (Zhang *et al.*, 1995) e melanomas (Potgens *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002) a isoforma aparentemente predominante é VEGFA₁₂₁, (Zhang *et al.*, 2000), enquanto que a variante VEGF₁₆₅ é encontrada em grande quantidade nos glioblastomas (Berkman *et al.*, 1993). Cheung *et al.*, (1998) mostraram que, em carcinoma pulmonar, a progressão da doença está associada com a expressão de VEGFA₁₈₉.

O mecanismo pelo qual as isoformas antiangiogênicas de VEGF limitam o crescimento tumoral ainda não está elucidado, contudo está claro que VEGFA_{165b} é capaz de se ligar tanto a VEGFR-1 (Cebe *et al.*, 2006) como VEGFR-2 (Woolard *et al.*, 2004), desencadeando fraca sinalização (Woolard *et al.*, 2004; Cebe *et al.*, 2006). De fato, Rennel *et al.*, (2009) verificaram que VEGFA_{121b} é capaz de se ligar com a mesma afinidade que as variantes pró-angiogênicas ao receptor VEGFR-2, porém inibindo a migração e atuando como citoprotetor das células endoteliais. É importante ressaltar que, apesar de descritos como antiangiogênicas, as isoformas VEGFA_{165b} e VEGFA_{121b} são capazes de estimular a proliferação de células endoteliais de maneira menos intensa que as variantes pró-angiogênicas, o que levou os autores a sugerirem a nomenclatura “fracamente angiogênica” (Catena *et al.*, 2010).

Devido à importância da neoformação vascular no desenvolvimento tumoral, a inibição angiogênica tem sido considerada um possível alvo para terapia anticâncer, porém recentemente várias estratégias têm sido estudadas

para avaliar os mecanismos dos agentes antiangiogênicos e com isso, terapias para o câncer de mama ([Bossung & Harbeeck, 2010](#)).

2.4. Bisfosfonatos e angiogênese

O potencial antiangiogênico dos BPs tem sido sugerido, uma vez que estes agentes reduzem a adesão e proliferação de células endoteliais, induzem apoptose destas células e reduzem a formação de vasos sanguíneos, *in vitro* e *in vivo* ([Fournier et al. 2002](#); [Wood et al., 2002](#); [Croucher et al., 2003](#); [Hamma-Kourbali et al., 2003](#); [Tang et al., 2010](#)). O tratamento intermitente com ZOL e CLO em modelos de ratos injetados com células tumorais B02/GFP.2 de câncer de mama, inibiu o crescimento de tumor ósseo, supondo que o uso antecipado de BPs no tratamento adjuvante de câncer de mama primário irá diminuir o risco de metástases ósseas ([Daubiné et al., 2008](#)).

Experimentalmente, os BPs CLO, risedronato, ibandronato e ZOL inibiram a proliferação de células endoteliais e a formação de capilares *in vitro*, assim como inibiram a revascularização de próstatas de ratos castrados sob a ação da testosterona ([Fournier et al., 2002](#)). [Hamma-Kourbali](#) e colaboradores observaram que a injeção de BP7033, um BP que não contém nitrogênio, inibiu o crescimento tumoral e a angiogênese em camundongos injetados com células tumorais A431, de carcinoma espinocelular de vulva. Paralelamente, observaram *in vitro* que BP7033 inibiu a proliferação e preveniu a formação de capilares de células endoteliais humanas HUVEC, em Matrigel ([Hamma-Kourbali et al., 2003](#)). ZOL

apresentou significativas propriedades inibitórias sobre a angiogênese induzida por FGF-2 em células HUVEC em cultura, em anéis de aorta e em camundongos tratados (Wood *et al.*, 2002). O tratamento com ZOL também diminuiu a densidade de microvasos em camundongos injetados com células de mieloma 5T2MM, conforme observado por imunohistoquímica para CD31 (Croucher *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que CLO e pamidronato inibiram a expressão de VEGF e levaram à degradação de HIF-1 α na angiogênese tumoral estimulada por IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), *in vitro* e *in vivo* em células de câncer de mama MCF-7 (Tang *et al.*, 2010). Dados pré clínicos, em camundongos, sugerem que a atividade antitumoral dos BPs é decorrente de múltiplos mecanismos, incluindo a inibição da angiogênese estimulada por células tumorais (Lipton, 2008; Soltau *et al.*, 2008), mais especificamente, inibição de VEGF (Amir *et al.*, 2008). Estudos de Walter e colaboradores (2010 e 2011) mostraram redução da viabilidade e da migração de células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos após tratamento *in vitro* com diversos BPs, sendo que pamidronato, ibandronato e ZOL apresentaram os efeitos mais significativos quando comparados com CLO. Segundo Clézardin e colaboradores (2005) estudos têm revelado amplas formas de se utilizar BPs na oncologia, explorando ao máximo seu potencial antitumoral.

Conforme mencionado anteriormente, os níveis séricos de VEGF estão relacionados com a sobrevida de pacientes com câncer (Lipton, 2008). Santini *et al.*, (2003, 2006) demonstraram diminuição significativa dos níveis séricos de VEGF e PDGF, bem como do marcador de *turnover* ósseo β CTX (*beta-isomerized*

C-terminal telopeptide of collagen type I), quando comparado com os valores basais de pacientes portadores de tumores sólidos e metástases ósseas, tratados com ZOL. Da mesma forma, o tratamento com ZOL reduziu os níveis séricos de VEGF de pacientes com câncer de mama avançado (Vincenzi *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2008), sugerindo que a adição dos BPs na terapia de câncer de mama promove melhorias da qualidade de vida e sobrevida destes pacientes (Coleman, 2011).

Por outro lado, não foram observadas mudanças nos níveis séricos dos fatores angiogênicos VEGF e FGF-2 após a injeção intravenosa de ZOL em pacientes com câncer de mama e pulmão, com metástases ósseas confirmadas (Tas *et al.*, 2008). No entanto, novos estudos são necessários para se avaliar a eficácia da utilização do ZOL como um medicamento antiangiogênico em associação com outros agentes quimioterápicos (Vincenzi *et al.*, 2005).

Diante das altas taxas de metástases ósseas, morbidade e mortalidade do câncer de mama, e considerando que pouco se sabe sobre a ação dos BPs sobre a angiogênese tumoral, avaliamos o potencial antiangiogênico destes agentes.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Analisar os mecanismos antitumorais e antiangiogênicos de bisfosfonatos (BPs) em linhagens celulares derivada de câncer de mama e de células endoteliais.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Estudar os efeitos do tratamento com BPs, *in vitro*, sobre a proliferação e viabilidade de células derivadas de câncer de mama, bem como de células endoteliais.
- ✓ Estudar os efeitos dos produtos secretados por células derivadas de câncer de mama tratadas com BPs, *in vitro*, sobre a proliferação de células endoteliais e sobre a formação de estruturas semelhantes a vasos e, *ex vivo*, sobre o crescimento de células endoteliais derivadas de aorta murina.
- ✓ Verificar os efeitos dos BPs sobre a expressão de VEGFA e de suas isoformas pró e antiangiogênicas em células derivadas de câncer de mama.
- ✓ Comparar os potenciais antitumoral e antiangiogênico de BP que não contém nitrogênio (CLO) com BP contendo nitrogênio (ZOL).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

Neste estudo foram utilizadas três linhagens celulares: MCF-7, HUVEC e RAEC. A linhagem **MCF-7** (*Michigan Cancer Foundation – 7*) é derivada de adenocarcinoma de mama de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade e foi comercialmente adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). A linhagem **HUVEC** (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) foi isolada a partir de culturas primárias de cordões umbilicais humanos e foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi (Instituto Butantan, São Paulo). A linhagem **RAEC** (*Rabbit Aortic Endothelial Cells*), derivada do endotélio de aorta de coelho, foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Helena B. Nader (Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Ciências Biomédicas, Unifesp, São Paulo).

As células foram cultivadas em frascos plásticos de 75 cm² (NUNC, Dinamarca) em meio de cultura DMEM (Invitrogen, EUA) para as **MCF-7** e HAM-F12 (Invitrogen) para as **RAEC**, suplementados com 10% de SFB (Cultilab, Brasil) e solução antibiótica e antimicótica (Invitrogen) na diluição de 1:100, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. O subcultivo celular foi realizado quando as culturas atingiam uma confluência de cerca de 80%. Para isto, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com 10 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e então incubadas com 2 ml de tripsina a 2% a 37°C. Após um período que variou de 1 a 3 min, o desprendimento

das células foi confirmado por observação em microscópio de contraste de fase e a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 5 ml de meio de cultura contendo 10% de SFB. A suspensão de células foi transferida para tubos cônicos de plástico de 15 ml estéreis (Corning, EUA) e estes centrifugados a 4.000 xg por 3 min. O sobrenadante foi removido e descartado e os *pellets* de células eram ressuspensos em 10 ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Cerca de 20 µl da suspensão de células eram usados para contagem em hemocítômetro e posterior montagem dos experimentos. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Visando trabalhar com células em passagens semelhantes, várias amostras de cada linhagem celular foram congeladas em nitrogênio líquido antes do início da realização dos experimentos, em solução contendo 20% de DMSO (Sigma, EUA) e 80% de SFB. Para o descongelamento, os criotubos eram colocados a 37°C e, após rápido descongelamento, as células eram transferidas para tubos de 15 ml contendo 5 ml de meio e centrifugadas. Os *pellets* eram então ressuspensos em 1 ml de meio de cultura e as células plaqueadas em frascos plásticos de 75 cm². Em todos os procedimentos de cultivo celular foram observados os cuidados para a manutenção da esterilidade, sendo as linhagens subcultivadas no máximo por dez passagens. Todos os experimentos apresentados neste trabalho foram feitos com o mesmo lote de SFB, a fim de se evitar variações indesejáveis no padrão de crescimento celular decorrentes de sua composição.

As **HUVEC** foram obtidas pela digestão das veias do cordão umbilical com 0,2 mg/ml de collagenase tipo IV (Sigma), como descrito anteriormente ([Jaffe et al.](#),

1973). As células foram cultivadas em garrafas plásticas 75 cm² em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) contendo 10% de SFB, 100 UI de penicilina / 100 µg/ml de solução estreptomicina (Cultilab), 2 mM L-glutamina (Sigma), 45 µg/ml heparina sódica (Liquemine, Roche, Brasil), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma), 50 µM 2-mercaptoetanol (Merck, Alemanha) e 25 µg/ml de suplemento de crescimento das células endoteliais de tecido neural bovino (ECG, Sigma) e suplemento derivado de cérebro de camundongos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Para todos os experimentos, as células HUVEC foram utilizadas apenas entre a primeira e terceira passagens.

4.2. Preparo das soluções de clodronato (CLO) e ácido zoledrônico (ZOL)

CLO (Sigma, EUA) foi dissolvido em PBS para uma concentração final estoque de 20 mM e estocado a -20°C. Acido zoledrônico (Zometa[®], Novartis, Suíça) é comercializado em ampolas a 2,75 mM, as quais foram aliquotadas e também estocadas a -20°C. Ambos BPs foram adicionados ao meio de cultura em concentrações crescentes, sendo que os controles receberam volume de PBS equivalente a maior concentração testada dos compostos.

4.3. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A citotoxicidade dos BPs utilizados foi determinada usando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) (Mosmann, 1983). O sal *tetrazolium* é reduzido a *formazan* pela enzima succinato

desidrogenase mitocondrial de células viáveis, fazendo do ensaio de MTT um bom método para determinação da porcentagem de viabilidade/inviabilidade celular (Mosmann, 1983), uma vez que células viáveis são capazes de reduzir o sal *tetrazolium* MTT, de cor amarela, em *formazan*, de cor púrpura. Cerca de 50.000 células foram plaqueadas em 2 ml de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes de CLO e ZOL. Completadas 48 h de tratamento, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura não suplementado, preparado com 0,3 mg/ml de MTT, sendo as células incubadas por 3 h a 37°C em atmosfera a 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida, o meio de cultura foi desprezado e, em cada poço, foi adicionado 1 ml de etanol absoluto (Merck, Alemanha), para a solubilização do *formazan* produzido. O conteúdo de cada poço foi homogeneizado e transferido para placas de 96 poços, obtendo-se a leitura da absorbância a 490 nm em leitor automático de ELISA (Bio Rad, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos controles.

4.4. Citometria de fluxo

Cerca de 10⁶ células/ml células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio e software CellQuest (Becton Dickinson, EUA). As populações celulares foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas separadamente por intensidade de fluorescência das sondas específicas.

4.5. Curvas de proliferação

Para avaliarmos os efeitos citotóxicos e antiproliferativos dos BPs estudados, cerca de 50.000 células foram plaqueadas em 2 ml de meio suplementado com 10% de SFB e antibióticos, em placas de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, contendo concentrações crescentes dos BPs. Após 48 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e os *pellets* foram ressuspensos em 1 ml de meio de cultura não suplementado. O número total de células foi determinado em citômetro de fluxo após 1 min de leitura em fluxo de 60 µl/min (Naliwaiko *et al.*, 2008).

4.6. Ensaio de proliferação de células endoteliais em meio condicionado pelas células MCF-7

Para verificar o efeito de fatores secretados por células MCF-7 sobre o crescimento de células endoteliais, foram plaqueadas células HUVEC (80.000/ml) ou RAEC (30.000/ml) em placas de 6 poços contendo meio, 10% de SFB e demais suplementos descritos anteriormente no **item 4.1**. Paralelamente, as células MCF-7 foram plaqueadas ($2,85 \times 10^5$ células/ml) em garrafas plásticas de 75 cm², cultivadas e tratadas com BPs por 24 h. Após 24 h do plaqueamento, o meio de cultivo das células endoteliais foi substituído por uma mistura de 80% de meio condicionado pelas células MCF-7 (1,2 ml) e 20% de meio fresco específico para o crescimento das células endoteliais (0,3 ml). Como controle, utilizou-se o meio condicionado pelas células MCF-7 sem tratamento com BPs. Após 24 e 48 h

de incubação com o meio condicionado, as células endoteliais foram coletadas e contadas para determinação do número total de células.

4.7. Modelo animal para estudo da angiogênese

Para analisar os efeitos *ex vivo* dos BPs sobre a angiogênese, foram realizadas culturas primárias de células endoteliais derivadas de aortas murinas. Foram utilizados 10 camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 5 a 8 semanas de vida, obtidos junto ao CEMIB-UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina[®] (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. As gaiolas permaneceram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 h. Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNICAMP (n° 2492-1 CEEA-IB-UNICAMP, Anexo I).

4.7.1. Proliferação de células endoteliais a partir de aortas murinas

A angiogênese foi analisada através do cultivo dos anéis de aorta de camundongo em matriz de colágeno (Masson *et al.*, 2002). A aorta torácica foi retirada de camundongos machos saudáveis, imediatamente após os sacrifícios e transferidas para uma placa de cultura contendo meio DMEM sem soro (**Figura 5**). O tecido periaórtico foi cuidadosamente removido com pinça e tesoura e os fragmentos seccionados em aproximadamente 10 anéis por aorta, com cerca de 2 mm de comprimento cada. Após as secções, os anéis foram transferidos para uma

placa de 100 mm de diâmetro, previamente dividida em 5 poços com diâmetro interno de 8 mm, cada um contendo 150 µl de uma solução com 7,5 vol de colágeno bovino tipo I a 2 mg/ml, reconstituído com 0,1 vol de NaOH e 1,5 vol de NaHCO_3 , acrescido de 1 vol de MCDB -131(Invitrogen, EUA). Cada poço recebeu 1 anel aórtico, os quais foram a seguir cobertos com a mesma solução de colágeno e, após a polimerização desta segunda camada, foram submersos em meio de cultura MCDB-131 adicionado de 2,5% de FCS (*Fetal Calf Serum*), 1% de L-glutamina e 5 ml de NaHCO_3 . Os anéis murinos foram tratados com meio condicionado por células MCF-7 tratadas ou não com BPs, conforme descrito no **item 4.6**. Os fragmentos foram observados durante 10 dias e fotografados em microscópio de contraste de fase a cada 2 dias.

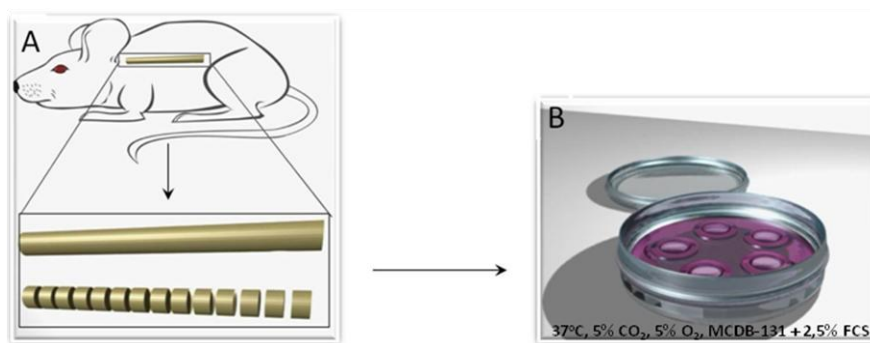


Figura 5: Proliferação de células endoteliais a partir de aortas murinas. (A) A aorta foi removida de camundongos C57BL/6 e, a seguir, cortada em pequenos fragmentos de proximadamente 2 mm. **(B)** Em placa de 100 mm de diâmetro foram preparados 5 poços de agarose contendo colágeno. Em cada poço foi colocado 1 explante, o qual recebeu em seguida uma segunda camada de colágeno. O meio de cultura com os tratamentos (CLO e ZOL) foi adicionado na placa e os explantes foram cultivados por 10 dias (*Figura cedida por Marco Antônio Cavallari Jr.*).

4.8. Ensaio *in vitro* de formação de estruturas semelhantes a vasos

Para avaliar os efeitos dos fatores liberados por células neoplásicas sobre a formação de estrutura semelhante a vasos sanguíneos, foi realizado ensaio *in vitro* de formação de tubos endoteliais (Hamma-Kourbalin *et al.*, 2003; Pyriochou *et al.*, 2007). Para isto, poços de uma placa de 96 poços foram revestidos com 45 µl de Matrigel (BD Biosciences, EUA) e mantidos por 1 h a 37°C. Após a polimerização, 3×10^4 células HUVEC foram semeadas sobre a matriz e incubadas na presença de meio condicionado por $2,85 \times 10^5$ células MCF-7 tratadas previamente com ZOL. Após 16 h de tratamento, os tubos endoteliais formados (*vessel-like*) foram fotografados em microscópio de contraste de fase e mensurados com auxílio de programa de computador Wimasis (GmbH, Alemanha) e Image J (Scion Corporation, EUA).

4.9. Ensaio de imunoabsorbância (ELISA)

O conteúdo total das proteínas VEGFA e VEGFA_{165b} foi mensurado através de ensaio de imunoabsorbância (ELISA), a partir de amostras de meio condicionado das células MCF-7, utilizados nos experimentos anteriormente descritos no **item 4.6**. Cerca de 5,0 µl de meio foram coletados, centrifugados a 4.000 xg por 3 min para a remoção dos debris e mantidos a -80°C até o momento das análises. O nível das proteínas em cada amostra foi determinado com o uso de kits comerciais VEGFA ou VEGFA_{165b} *enzyme-linked immunosorbent assay* para as células MCF-7 (Human VEGFA DuoSet ELISA, R&D Systems, EUA),

conforme instruções do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas por 16 h a temperatura ambiente com anticorpos anti-VEGFA ou anti-VEGFA_{165b}. Após este período, para bloqueio da reação, as amostras foram incubadas com 100 µl da solução 1% BSA em PBS. Passado 1 h, foram feitas lavagens (com PBS 1 X 0,05% Tween 20 - Sigma), e incubadas com 100 µl de cada amostra. Após 2 h, as lavagens foram repetidas e deixou a placa por incubação por 2 h com anticorpo de detecção. Após este período, novamente realizou-se as lavagens e foi adicionado Streptavidina HRP, após 20 min de incubação, foram realizadas as últimas lavagens e foi adicionado 100 µl da solução com substrato (tetrametilbenzeno), após 20 min adicionou-se 50 µl de 2 N H₂SO₄ para parar a reação. Para determinar a densidade óptica de cada poço foi usado leitor de microplacas da Molecular Devices (Ca, EUA) e as leituras foram realizadas em 450 e 540 nm. Para a normalização dos resultados foi utilizado o número total de células.

5.0. Expressão das isoformas de VEGFA

5.1. Purificação de RNA e RT-PCR quantitativa

Os efeitos dos BPs sobre a expressão das isoformas de VEGFA em células MCF-7 foram determinados através de RT-PCR quantitativa. Cerca de $2,85 \times 10^5$ células MCF-7 foram plaqueadas em frascos plásticos de 75 cm² e, após 24 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por meio novo contendo BPs. Após mais 48 h, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a 4.000 xg por 3 min e os *pellets* foram imediatamente congelados a -80°C.

RNA total foi purificado dos *pellets* celulares usando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen). Foram determinadas a concentração e pureza do material obtido em espectrofotômetro, com comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para verificação da qualidade dos RNAs obtidos, cerca de 2 µg de cada amostra foram separados em gel de agarose a 1,2%, corado com brometo de etídio. Antes das reações para a transcrição reversa (RT, *Reverse Transcription*), todas as amostras de RNA total foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade, Invitrogen) por 10 min, a temperatura ambiente. Para a síntese dos cDNAs, 4 µg de RNA total foram reversamente transcritos em reações com volume final de 38 µl, contendo 0,5 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNase, 50 U da enzima Superscrit III RT (Invitrogen), 0,5 µg de *primers* Oligo-dT (Invitrogen). As reações foram realizadas a 50°C por 60 min, seguidas de incubação a 70°C por 15 min. Para a amplificação específica dos cDNAs, *primers* para VEGFA foram desenhados (**Tabela 1**). Os transcritos de VEGFA foram amplificados em reações de 25 µl contendo 2 µl de cDNA, 12,5 µl da solução de Master Mix Fast SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, UK) e 0,2 mM de cada *primer*. As condições de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa foram 95°C por 10 min, desnaturação a 95°C por 30 s e anelamento a 60°C por 1 min e em 40 ciclos. Para normalização dos resultados, foram testados individualmente como controles endógenos os transcritos para GAPDH, β-actina, TATA BOX e PPIA e RPLP0, sendo os mais adequados: TATA BOX para as amostras tratadas com ZOL e PPIA para as amostras tratadas com CLO.

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados para a amplificação de VEGFA humano e suas isoformas

Descrição	Sequência	Código no Genbank
VEGFA total Forward	5'-CGAGGGCCTGGAGTGTGT-3'	NM_001025366
VEGFA total Reverse	5'-CGCATAATCTGCATGGTGATG-3'	
VEGFA ₁₈₉ Forward	5'-CGAGGAAAGGGAAAGGGGC-3'	NM_003376
VEGFA ₁₈₉ Reverse	5'-CCCACAGGGAACGCTCCAG-3'	
VEGFA ₁₆₅ Forward	5'-CCAATGCAGATTATGCGGATC-3'	NM_001025368
VEGFA ₁₆₅ Reverse	5'-CAAGGCCACAGGGATTTTC-3'	
VEGFA ₁₂₁ Forward	5'-ATGCAGATTATGCGGATCAAACC-3'	NM_001025370
VEGFA ₁₂₁ Reverse	5'-CGGCTTGTACATTTTCTTGTC-3'	
VEGFA _{189b} Forward	5'- CCTGGTGAGAGATCTGCAGTACG-3'	NM_001025366
VEGFA _{189b} Reverse	5'- GTC-3'TGGAGCGTTCCCTGTG-3'	
VEGFA _{121b} Forward	5'- GCGGATCAAACCTCACCAAG-3'	NM_001025366
VEGFA _{121b} Reverse	5'- TCCTGGTGAGAGATTTTCTTGTC-3'	
VEGFA _{165b} Forward	5'-CAAGAAAATCCCTGTGGGCC-3'	NM_001033756
VEGFA _{165b} Reverse	5'-TGAGAGATCTGCAAGTACGTTTCG-3'	
β-actina Forward	5'- CCAGCTCACCATGGATGATG-3'	NM_001101.3
β-actina Reverse	5'- ATGCCGGAGCCGTTGTC-3'	
GAPDH Forward	5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'	NM_002046.3
GAPDH Reverse	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'	
PPIA Forward	5'-GCTTTGGGTCCAGGAATGG-3'	NM_021130.3
PPIA Reverse	5'-GTTGTCCACAGTCAGCAATGGT-3'	
TATA BOX Forward	5'-ACCGCGCAGCGTGACT-3'	NM_001172085.1
TATA BOX Reverse	5'-AGCGCTGCCCAGATAGCA-3'	
RPLP0 Forward	5'-TTTAAACCCTGCGTGGCAAT-3'	NM_053275
RPLP0 Reverse	5'-CTGTCTTCCCTGGGCATCA-3'	

5.2. Expressão de VEGFA e de suas isoformas

Primers específicos foram delineados a partir das sequências das respectivas isoformas de RNAs mensageiros provenientes do *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, EUA - www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a amplificação das variantes pró-angiogênicas foram desenhados *reverse primers* nas divisas dos éxons específicos de cada isoforma (**Tabela 1**): entre os éxons 5/8 para VEGFA₁₂₁, entre 5/7 para VEGFA₁₆₅, e finalmente entre 6a/7 para VEGFA₁₈₉. Para amplificar as isoformas antiangiogênicas (VEGFA_{121b}, VEGFA_{165b} e VEGFA_{189b}) os *forward primers* foram desenhados nas mesmas regiões mencionadas, sendo os *reverse primers* colocados na região específica destas isoformas, no éxon 8b. A análise da expressão gênica foi realizada através do método das curvas padrão. A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método da quantificação relativa a amostras controle (tratadas com PBS), corrigidas por um controle endógeno (TATA BOX e PPIA). Calculou-se a expressão gênica por equação matemática, que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (SDS version 2.0, Applied Biosystems).

6.0. Forma de análise dos resultados

Os resultados foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média) de, pelo menos, três experimentos independentes, em duplicata ou triplicata. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$), verificado através do teste *t* de Student não pareado. A análise da expressão gênica foi realizada pelo software SDS version 2.0 (Applied Biosystems).

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos dos BPs sobre a proliferação e viabilidade de células derivadas de câncer de mama (MCF-7) em cultura

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de células imortalizadas MCF-7, estrógeno-responsiva, derivada de metástase pleural de adenocarcinoma de mama de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade. Trata-se da linhagem de carcinoma de mama mais utilizada experimentalmente, juntamente com a linhagem MDA-MB-231, estrógeno não-responsiva. Ainda segundo [Verdijk](#) e colaboradores ([2007](#)), MCF-7 é a linhagem de câncer de mama mais sensível ao tratamento com ZOL e CLO, quando comparada com células das linhagens T-47D e MDA-MB-231.

As células da linhagem MCF-7 crescem em monocamadas quando em superfícies plásticas, apresentam aspecto poligonal, citoplasma volumoso e se agrupam em *clusters*, na tentativa de formar estruturas ductais (**Figura 6 A**). O tratamento das MCF-7 com concentrações crescentes de CLO não alterou a morfologia celular, mesmo na maior concentração testada, de 100 µM (**Figura 6 B**). Ao contrário do CLO, o tratamento das MCF-7 com ZOL resultou em menor número de células, as quais se mostraram com aspecto mais fusiforme, especialmente nas maiores concentrações analisadas (**Figuras 6 C e D**).

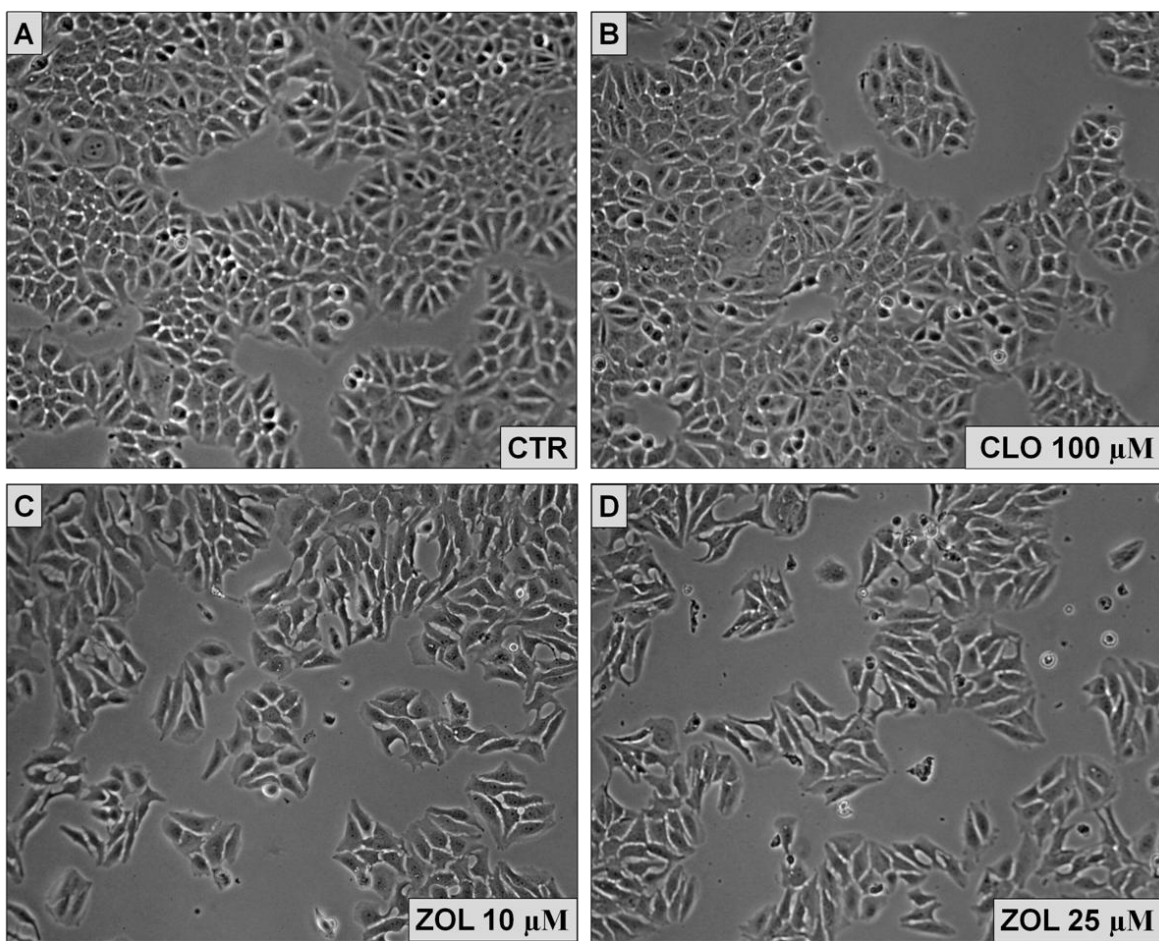


Figura 6: Alterações morfológicas das células MCF-7 após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). Microscopia de contraste de fase de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 após 24 h de incubação com CLO (100 μ M, **B**) ou ZOL (10 e 25 μ M; **C e D**). As células controle foram incubadas apenas com PBS (**A**). Aumento original de 40X.

BPs são moléculas hidrofílicas, pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal após administração oral (~ menos de 1%), e apenas 50% da droga absorvida é retida no tecido ósseo, enquanto o restante é eliminado pela urina, sem que haja sua metabolização (Russell *et al.*, 1970; Lin, 1996). Enquanto a concentração sérica dos BPs é de 5 μ M imediatamente após infusão, no tecido ósseo seus níveis podem chegar a 500 μ M (Chen *et al.*, 2002).

Avaliamos, então, os efeitos de concentrações crescentes dos BPs sobre a proliferação e a viabilidade das células MCF-7. Apesar do ZOL ter reduzido a proliferação celular de maneira dose-dependente (**Figura 7 A**), o que está de acordo com as observações feitas das células em cultura (**Figura 6**), não foi observada redução da viabilidade das células MCF-7 nas menores concentrações estudadas, de 1 e 5 μ M (**Figura 8**). Ao contrário, o tratamento com CLO não alterou o crescimento e a viabilidade das células de câncer de mama, conforme demonstrado nas **Figuras 7 B e 8**.

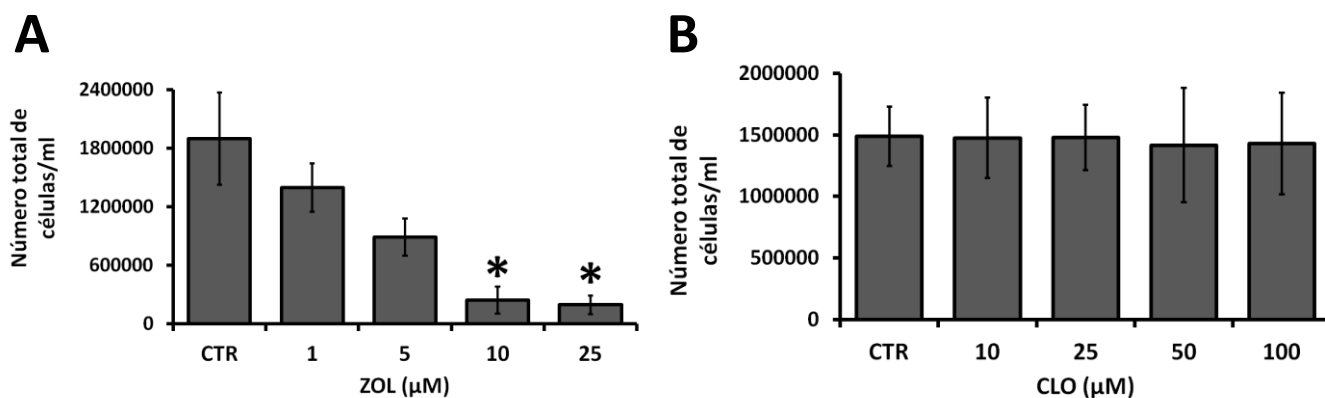


Figura 7: Curvas de proliferação das células MCF-7 após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células MCF-7 foram tratadas com doses crescentes de ZOL ou CLO por 48 h, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, somente as células aderidas foram coletadas e contadas em citômetro de fluxo. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, ZOL *versus* controle (CTR), teste *t* de Student.

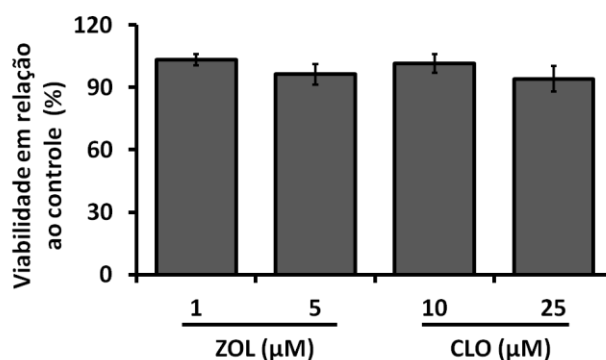


Figura 8: Viabilidade das células MCF-7 após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células MCF-7 foram tratadas com diferentes doses de ZOL ou CLO por 48 h, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os valores representam a média \pm EPM de 4 experimentos distintos.

ZOL mostrou efeito dose-dependente de redução da proliferação celular sem alterar sua viabilidade (**Figuras 7 A e 8**). Isso nos fez analisar os efeitos dos BPs sobre a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. As células foram plaqueadas e, após 24 h, o meio de cultura foi trocado por meio novo, na ausência de SFB, a fim de se promover a sincronização das células em G0/G1. Completadas essas 24 h, o meio de cultura novamente foi trocado por meio novo, contendo 10% de SFB e os BPs estudados. Após 48 h de tratamento, as células foram coletadas e analisadas as fases do ciclo celular. A **Figura 9** mostra que o tratamento com ZOL reduziu a proliferação das células MCF-7, demonstrada pela diminuição da porcentagem de células na fase S e aumento das células em G0/G1. Os tratamentos com 1 e 5 μM de ZOL levaram a uma redução de cerca 10 e 20% das células na fase S, respectivamente, em relação aos seus controles. Por outro lado, as concentrações de 10 e 25 μM de CLO não modificaram o perfil do ciclo celular das células MCF-7, confirmando os resultados anteriores sobre proliferação e viabilidade (**Figuras 7 B e 8**).

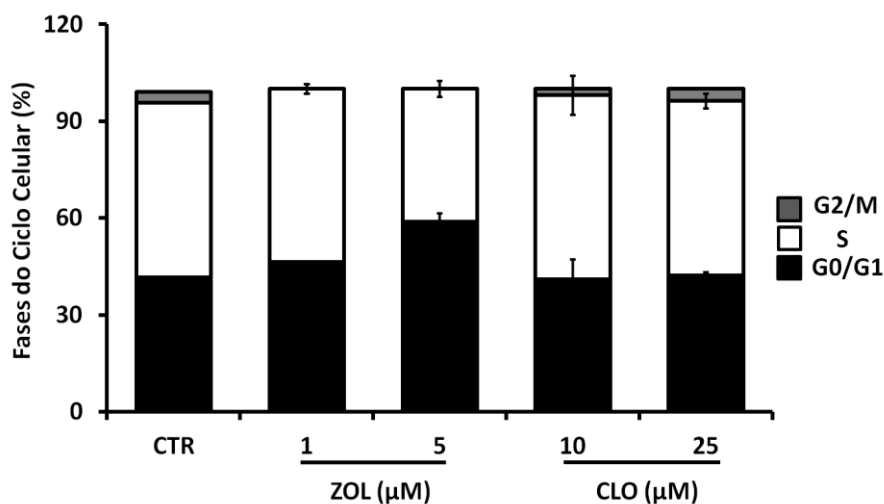


Figura 9: Distribuição das células MCF-7 nas diferentes fases do ciclo células após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células MCF-7 foram plaqueadas, sincronizadas por 24 h e tratadas com concentrações crescentes de ZOL ou CLO por 48 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo após marcação com de iodeto de propídeo. Os valores representam a média \pm EPM de 2 experimentos distintos.

5.2. Efeitos *in vitro* dos BPs sobre a proliferação e viabilidade de células endoteliais derivadas de aorta de coelho (RAEC) e de cordão umbilical humano (HUVEC)

Paralelamente foram avaliados os efeitos dos BPs quando adicionados diretamente sobre células endoteliais provenientes de aorta de coelho, RAEC, e de cordão umbilical humano, HUVEC. Houve uma expressiva redução do número total de células RAEC após tratamento com 1 e 5 μ M de ZOL, mas estas células mostraram-se menos sensíveis ao tratamento com CLO (**Figura 10**). Mesmo com

redução da proliferação, a viabilidade celular não foi alterada após tratamento com os BPs (**Figura 11**), assim como observado para as células de câncer de mama, MCF-7 (**Figura 8**). O tratamento das células HUVEC com 5 μM de ZOL diminuiu a viabilidade celular em 15%, enquanto CLO não foi capaz de induzir morte nas concentrações testadas (**Figura 12**).

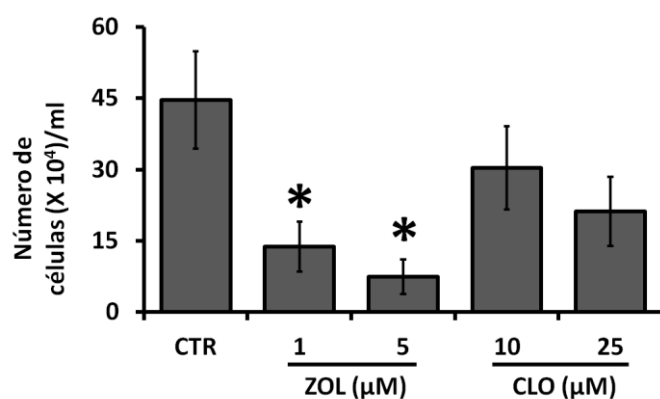


Figura 10: Curvas de proliferação das células RAEC após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células RAEC foram tratadas com diferentes doses de ZOL ou CLO por 24 h, em meio HAM-F12 suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, somente as células aderidas foram coletadas e contadas. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, ZOL *versus* controle (CTR), teste *t* de Student.

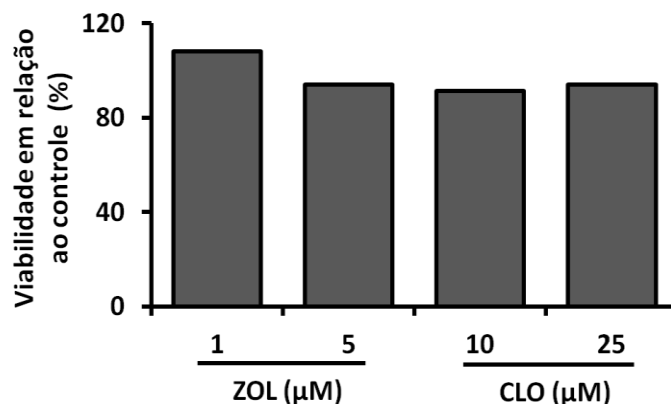


Figura 11: Viabilidade das células RAEC após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células RAEC foram tratadas com diferentes concentrações de ZOL ou CLO por 48 h, em meio HAM-F12 suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT.

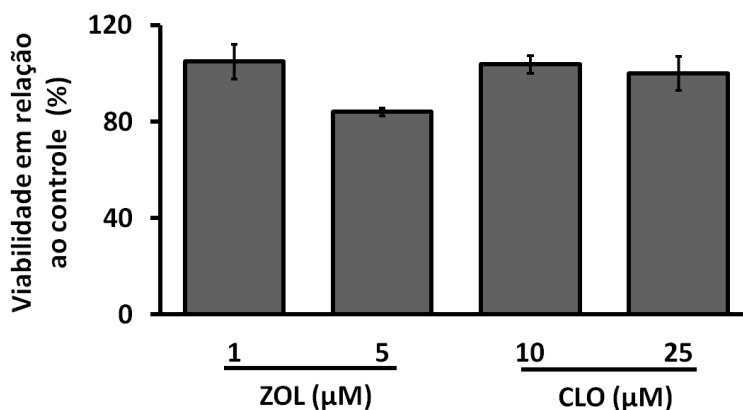


Figura 12: Viabilidade das células HUVEC após tratamento com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO). As células HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações de ZOL ou CLO por 48 h, em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos.

5.3. Efeitos *in vitro* dos produtos secretados pelas células de câncer de mama (MCF-7) tratadas com BPs sobre a proliferação de células endoteliais

Foram analisados os efeitos que proteínas secretadas pelas células derivadas de câncer de mama (MCF-7) apresentam sobre a proliferação de células endoteliais. Para isso, as mesmas foram incubadas com meio de cultura específico e fresco, acrescido de 80% de meio de cultura previamente condicionado por $\sim 3 \times 10^5$ células MCF-7, por um período de 24 h. Observamos que as células RAEC não responderam ao tratamento com meio condicionado pelas MCF-7, provavelmente por serem de origens distintas, *ie*, coelho e humana, respectivamente (*dados não mostrados*). Isso se reforça no fato das células endoteliais humanas HUVEC mostrarem aumento da proliferação após incubação com esse mesmo meio condicionado por células MCF-7, na ausência de qualquer tratamento (**Figura 13 A**). O potencial antiangiogênico de ZOL pôde ser evidenciado pela redução do número de células HUVEC após incubação com meio previamente condicionado pelas células MCF-7 tratadas com este BP (**Figura 13 A**). Após 48 h de incubação com meio condicionado, houve 76% de redução do número de células HUVEC (**Figura 13 A**). Por outro lado, o tratamento das MCF-7 com 25 μ M de CLO não alterou as taxas de crescimento das células endoteliais HUVEC (**Figura 13 B**).

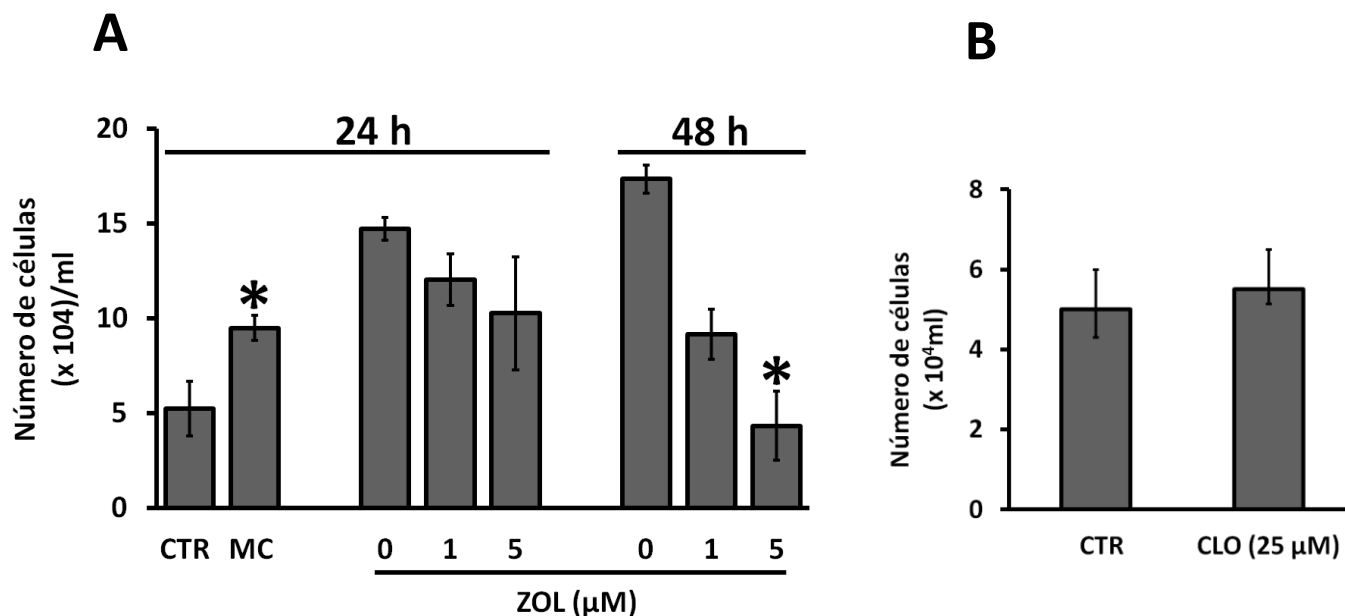


Figura 13: Efeitos do meio condicionado por células MCF-7 tratadas com BPs ácido zoledrônico (ZOL) e clodronato (CLO) sobre a proliferação de células HUVEC. As células HUVEC foram incubadas com meio condicionado (MC) por células MCF-7 na ausência ou presença de ZOL (**A**) ou CLO (**B**), em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após as incubações, somente as células aderidas foram coletadas e contadas. Os valores representam a média \pm EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, MC ou ZOL *versus* controle (CTR), teste *t* de Student.

5.4. Efeitos *ex vivo* dos produtos secretados pelas células de câncer de mama (MCF-7) tratadas com BPs sobre o crescimento de células derivadas de aorta murina

Anéis de aorta foram obtidos a partir de camundongos machos C57BL/6, com 5 a 8 semanas de vida, na ausência de qualquer tratamento, conforme descrito no **item 4.7** de *Materiais e Métodos*. Os anéis foram incubados com meio de cultura condicionado por células MCF-7 tratadas previamente com os BPs por 24 h. Para evitar o crescimento de pericitos e fibroblastos, foi utilizado o meio MCDB131, específico para células endoteliais, e meio condicionado pelas MCF-7 sem SFB, a fim de evitar a presença de FGF, pró-angiogênico. A **Figura 14** mostra que houve menor proliferação das células endoteliais derivadas de aorta, sugerindo que o tratamento das MCF-7 com ZOL induziu resposta antiangiogênica nas células tumorais. Novamente o tratamento com CLO não mostrou efeito antiangiogênico na concentração testada, de 25 μ M (*dados não mostrados*).

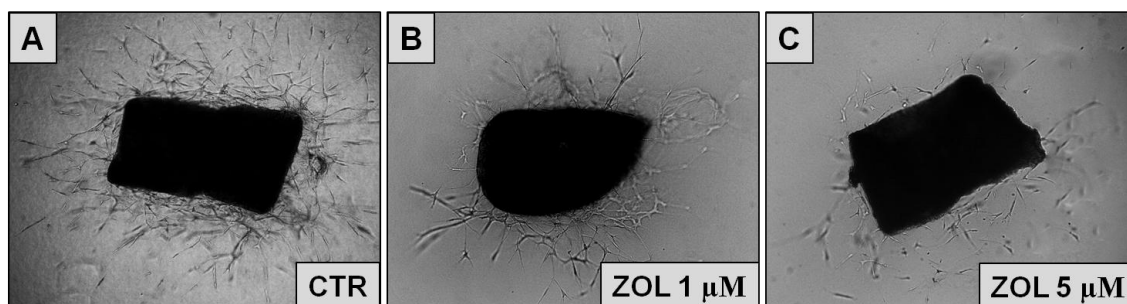


Figura 14: Proliferação de células endoteliais a partir de anéis de aorta murina incubados com meio condicionado por células MCF-7 tratadas com ácido zoledrônico (ZOL). Aortas torácicas de camundongos foram removidas e cortadas em fragmentos de 2 mm, os quais foram cultivados em colágeno tipo I durante 10 dias. Cada explante foi incubado com PBS (**A**) ou com meio condicionado por células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de ZOL (**B** e **C**). Aumento original de 50X.

5.5. Efeitos *in vitro* dos produtos secretados pelas células de câncer de mama (MCF-7) tratadas com BPs sobre a formação de estruturas semelhantes a vasos por células endoteliais

Foram realizados ensaios *in vitro* para verificar os efeitos do meio condicionado por células MCF-7 sobre a formação de estruturas semelhantes a vasos (*vessel-like*) por células endoteliais HUVEC, conforme metodologia descrita por [Pyriochou](#) e colaboradores (2007). Verificamos que o tratamento prévio das MCF-7 com 5 μ M de ZOL reduziu em 36,5% a extensão dos túbulos formados pelas células HUVEC (**Figura 15 A**). A quantidade dos túbulos também foi significativamente alterada na presença do meio condicionado, com 42,5% de

redução (**Figura 15 B**), indicando novamente o potencial antiangiogênico do ZOL através das células de câncer de mama.

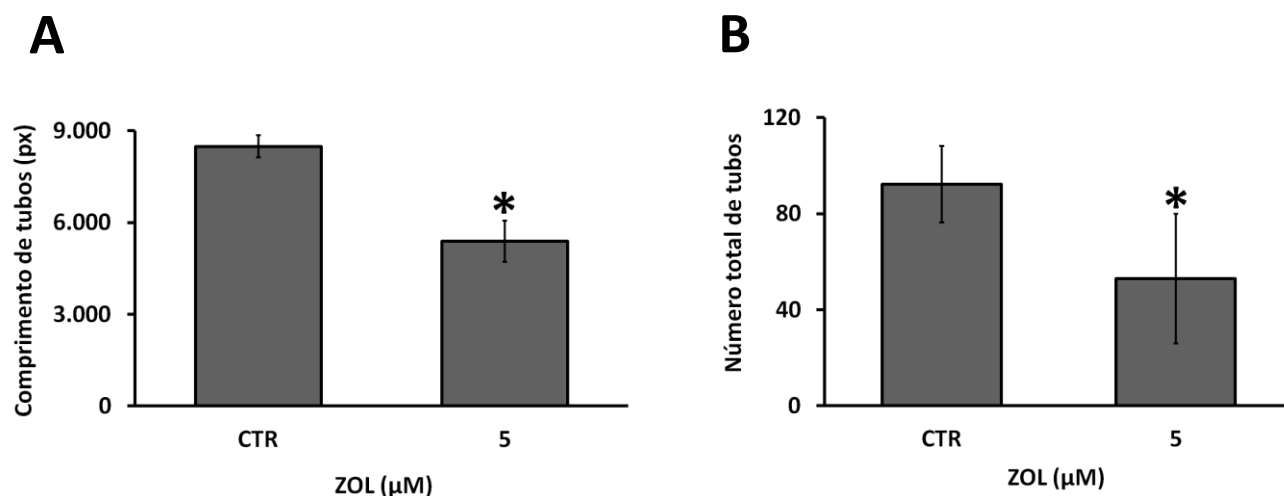


Figura 15: Efeitos do meio condicionado por células MCF-7 tratadas com ácido zoledrônico (ZOL) sobre a angiogênese *in vitro*. A formação de estruturas semelhantes a vasos por células endoteliais HUVEC foi analisada após incubação das mesmas com meio condicionado por células MCF-7 tratadas com 5 μM de ZOL. Foram mensurados a extensão das estruturas tubulares, medida em pixels (**A**) e do número total de túbulos (**B**) formados pelas células HUVEC. Os valores representam a média ± EPM de 2 experimentos distintos; * $p < 0,05$, ZOL *versus* controle (CTR), teste *t* de Student.

5.6. Dosagem de VEGFA total no meio condicionado pelas células derivadas de câncer de mama (MCF-7) tratadas com ácido zoledrônico

Conforme mostrado anteriormente, houve redução da proliferação de células endoteliais HUVEC (**Figura 13 A**) e de aorta murina (**Figura 14**), em conjunto com redução da angiogênese *in vitro*, na presença do meio condicionado por células MCF-7 tratadas com ZOL (**Figura 15**). Estes resultados sugerem que a ação antiangiogênica do ZOL seja através da redução da quantidade de fatores pró-angiogênicos disponíveis nesse meio condicionado, ou através do aumento de fatores antiangiogênicos. Desse modo, a quantidade da proteína VEGFA presente no meio condicionado pelas células MCF-7 foi dosada por ensaio de imunoabsorbância. De fato, o tratamento com ZOL reduziu os níveis protéicos de VEGFA no meio de cultura das células MCF-7, quando comparadas com o controle (**Figura 16 A**). Apesar de não significativo, observamos tendência a níveis mais elevados da isoforma antiangiogênica VEGFA_{165b} no meio de cultura das células MCF-7 tratadas com este BP (**Figura 16 B**).

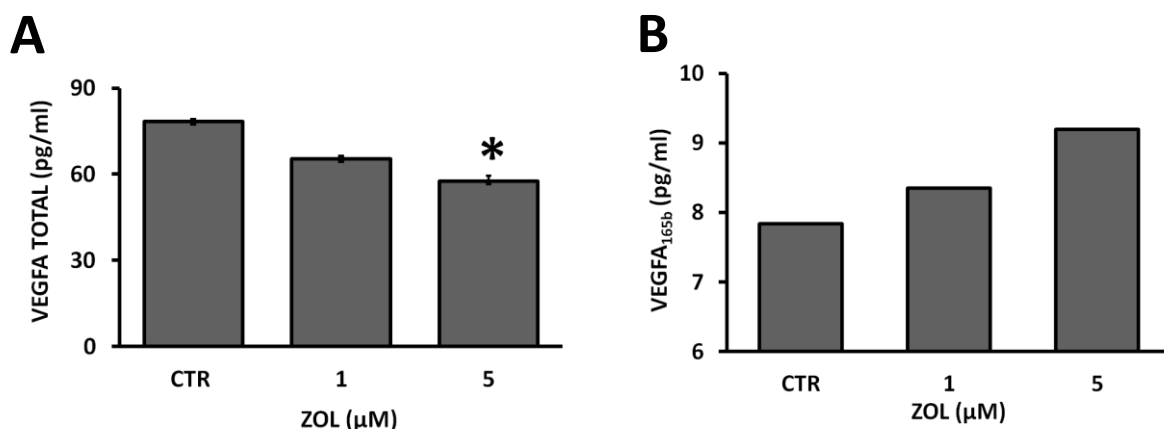


Figura 16: Quantificação dos níveis de VEGFA e da isoforma VEGFA_{165b} no meio condicionado pelas células MCF-7 tratadas com ácido zoledrônico (ZOL). As células MCF-7 foram tratadas com 1 e 5 μM de ZOL por 24 h. Em seguida, foram quantificados níveis de VEGFA (**A**) e de sua isoforma VEGFA_{165b} (**B**) por ELISA. Os valores representam a média ± EPM de 3 experimentos distintos; * $p < 0,05$, ZOL *versus* controle (CTR), teste *t* de Student.

5.7. Efeitos dos BPs sobre a expressão de RNAs mensageiros para VEGFA, *in vitro*, células derivadas de câncer de mama (MCF-7)

Os efeitos dos BPs sobre a expressão das isoformas de VEGFA em células MCF-7 foram determinados através de RT-PCR quantitativa. Foram desenhados e testados *primers* para amplificar VEGFA total e suas isoformas VEGF₁₂₁, VEGF_{121b}, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₉, e VEGF_{189b}. Um contratempo nesses experimentos foi encontrar o controle endógeno ideal. Foram testados *primers* para os genes β-actina e GAPDH, porém houve grande variação nos CTs (*cycle threshold*, ie, o número de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse

o nível do *background*) das amostras e curvas padrão. Sendo assim, foram testados outros genes, RPS18 (*ribosomal protein S18*) e HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), também sem sucesso. Na literatura não há um consenso sobre controles endógenos para as células MCF-7 ou quando se utiliza BPs. Em diferentes amostras de câncer de mama, os genes mais estáveis e confiáveis foram MRPL19 e PPIA (McNeill *et al.* 2007). Segundo Valenti e colaboradores (2005), por exemplo, GAPDH não deve ser utilizado em estudos que investigam efeitos dos BPs sobre o tecido ósseo ou em células cancerígenas, por este gene mostrar-se sensível a esse tipo de composto. Kok e colaboradores (2005) avaliaram a eficácia de 13 BPs em diversos tecidos congelados, incluindo mama normal, fibroadenoma e adenocarcinoma de mama, concluindo que o melhor *housekeeping* é o gene HPRT. Foram então testados outros 3 genes: TATA BOX, PPIA (*peptidylprolyl isomerase A* ou ciclofilina A) e RPLP0 (*acidic ribosomal phosphoprotein P0*), sendo que para cada BP estudado um destes controles endógenos foi escolhido. Para os experimentos nos quais as células MCF-7 foram tratadas com ZOL, foi utilizado o *housekeeping* TATA BOX e para o tratamento com CLO, PPIA foi utilizado.

O tratamento das células MCF-7 com 10 e 25 μ M de CLO não alterou a expressão de VEGFA total, concordando com os demais resultados mostrados utilizando este BP (*dados não mostrados*). Como observado na **Figura 17**, ZOL resultou em discreto aumento (~20%) da quantidade dos mensageiros para VEGFA total nas células de câncer de mama, em comparação com seus

controles. Parte deste aumento pode ser explicada pela maior expressão das isoformas angiogênicas VEGF₁₂₁ (~3x), VEGF₁₆₅ (~2,2x) e VEGF₁₈₉ (~3x) após tratamento com ZOL, nem sempre de maneira dose-dependente. Mas, apesar da indução da expressão de fatores pró-angiogênicos, o tratamento com ZOL também resultou em aumento de 4,2x na expressão da isoforma VEGFA_{165b}, antiangiogênica (**Figura 18**). As demais isoformas antiangiogênicas testadas, VEGF_{121b} e VEGF_{189b} não foram amplificadas com sucesso nas células MCF-7.

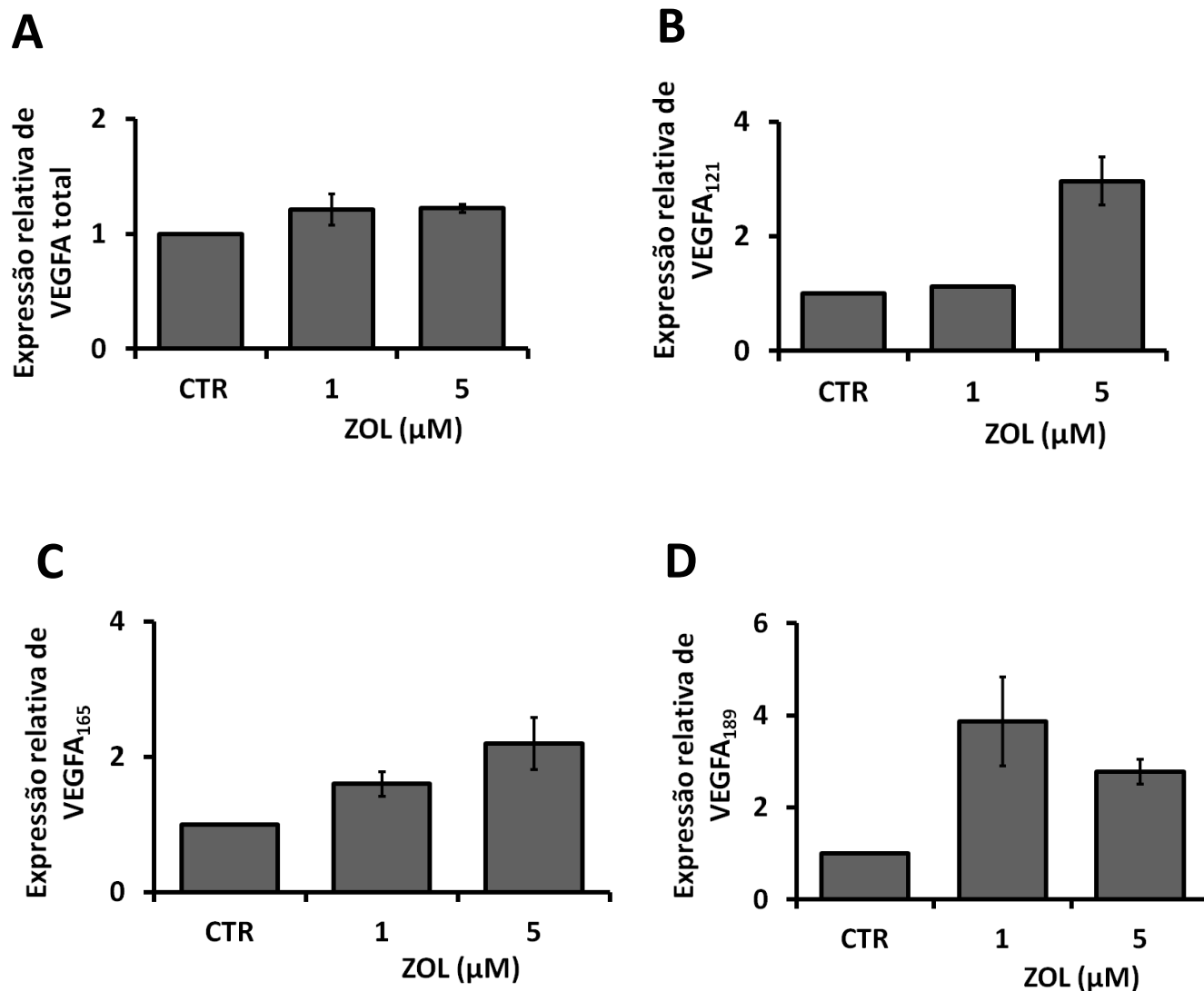


Figura 17: Expressão relativa de RNAs mensageiros para VEGFA total e suas isoformas após o tratamento das células MCF-7 com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZOL). As células MCF-7 foram tratadas com diferentes doses de ZOL por 24 h, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, as células foram coletadas e os RNAs totais extraídos para análise da expressão de VEGFA total (**A**) e de suas isoformas pró-angiogênicas 121 (**B**), 165 (**C**) e 189 (**D**), conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

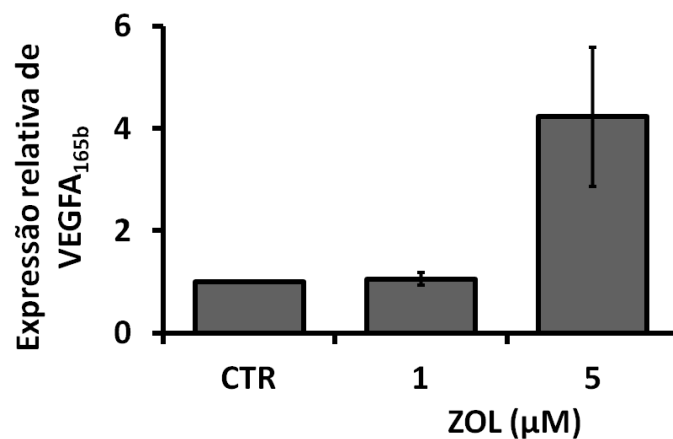


Figura 18: Expressão relativa de RNAs mensageiros para a isoforma VEGFA_{165b} após o tratamento das células MCF-7 com diferentes concentrações de ácido zoledrônico (ZOL). As células MCF-7 foram tratadas com diferentes doses de ZOL por 24 h, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após o tratamento, as células foram coletadas e os RNAs totais extraídos para análise da expressão da isoforma antiangiogênica VEGFA_{165b}, conforme descrito em *Materiais e Métodos*.

6. DISCUSSÃO

Em 1968, Fleish e colaboradores iniciaram os primeiros relatórios sobre o conhecimento biológico dos bisfosfonatos (BPs). Hoje, há mais de 40 anos, os BPs são os agentes de escolha na redução de reabsorções óssea em doenças que afetam o esqueleto (Fleish, 2002). Devido ao alto poder de inibição da reabsorção óssea, os BPs são opções efetivas na terapia de complicações secundárias no esqueleto por metástases ósseas (Coleman *et al.*, 2005; Lipton *et al.*, 2008). Os BPs também têm mostrado efeitos antitumorais através do bloqueio de adesão, proliferação e sobrevivência de células malignas, aprimorando o efeito citotóxico de vários agentes antineoplásicos, além de inibir importantes etapas da angiogênese tumoral (Clézardin *et al.*, 2003).

O termo “angiogênese” foi introduzido a fim de descrever tratamentos designados para a prevenção da formação de novos vasos e na tentativa de reduzir aqueles já existentes. O crescimento neoplásico tem sido bloqueado experimentalmente através de terapias que têm como alvo a vascularização tumoral ou através da inibição direta da proliferação e migração das células endoteliais. Alternativamente, drogas antiangiogênicas previnem a inibição de fatores tumorais pró-angiogênicos de forma indireta, através da intervenção de seus receptores endoteliais (Ribatti *et al.*, 2008). Inibidores da angiogênese bloqueiam quaisquer das várias etapas na cascata da angiogênese, incluindo proliferação, ligação, migração e invasão de células endoteliais a MEC (Folkman, 1995).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o potencial antiangiogênico dos BPs os quais, além de inibir a adesão e proliferação de células endoteliais, reduzem a formação de tubos semelhante a capilares, evitando assim a formação de novos vasos sanguíneos (Fournier *et al.*, 2002; Santini *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2002; Hamma-Kourbali *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2007; Ribatti *et al.*, 2008). Assim sendo, avaliamos a ação antiangiogênica de BPs de grupos diferentes, sendo um do grupo da primeira geração, CLO e outro da terceira geração, ZOL, em linhagem celular derivada de câncer de mama, MCF-7.

Em nosso trabalho observamos que ZOL, mas não CLO, reduziu a proliferação das MCF-7 de maneira dose-dependente. Apesar do tratamento com BPs não ter alterado a viabilidade das MCF-7, ZOL resultou em bloqueio da proliferação celular, evidenciado por análises de ciclo celular. Efeitos antiproliferativos dos BPs foram previamente mostrados em linhagens de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 e Hs578T), onde o tratamento com 20 μ M de ZOL por 96 h reduziu em 50% a proliferação celular (Senaratne *et al.*, 2000). De acordo com nossos achados, ZOL também mostrou ser um BP mais eficaz em comparação ao CLO, que apresentou poucos efeitos sobre a proliferação de células de câncer de mama. Em outro estudo com ZOL em células MCF-7, baixas concentrações deste BP não alteraram a proliferação celular mesmo após 72 h de tratamento. No entanto, concentrações que variaram de 10 a 100 μ M resultaram em significativa redução do número dessas células (Jagdev *et al.*, 2001). ZOL também mostrou grande efeito citotóxico em células de câncer de mama MCF-7, T47D e MDA-MB-231, quando as mesmas foram tratadas com altas

concentrações (100 μ M) e a longo prazo ([Fromigue et al., 2000](#)). Ao contrário do que verificamos no presente trabalho, [Senaratne](#) e colaboradores (2000) relataram irreversível perda da viabilidade celular nas células de câncer de mama após 24 h de tratamento com BPs, e tal diferença pode ser explicada pelas menores concentrações que utilizamos, quando comparadas com o estudo citado.

Os mecanismos relatados anteriormente têm sido sugeridos para explicar os efeitos diretos e indiretos dos BPs na atividade antitumoral, com maior destaque para o potencial antiproliferativo desses agentes. Assim como mostram nossos achados, parece haver um consenso na literatura quanto a uma maior eficácia dos BPs que contém nitrogênio, tais como ZOL e pamidronato, em relação aos BPs que não contém nitrogênio, principalmente CLO, no que diz respeito à redução da viabilidade, proliferação e apoptose em células de câncer de mama ([Fromigue et al., 2000](#); [Senaratne et al., 2000](#); [Kars et al., 2007](#); [Verdijk et al., 2007](#); [Tang et al., 2010](#)). No trabalho de [Carbonare](#) e colaboradores (2005), por exemplo, o tratamento com 100 μ M de CLO por 48 h não apresentou nenhum efeito sobre a viabilidade e proliferação de células MCF-7. Em nosso estudo, utilizamos baixas concentrações de ambos BPs estudados, tendo em vista que seus níveis séricos máximos não passam de 5 μ M ([Chen et al., 2002](#)). Mesmo assim, na maioria de nossos ensaios a concentração máxima testada de CLO foi 5x maior do que a concentração circulante nos pacientes que fazem uso de BPs. Apesar de parecer menos eficaz, Tang e colaboradores (2010) mostraram que CLO, nas concentrações de 25, 50 e 100 μ M, reduziu a viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-468 e anulou o estímulo de IGF-1 pelas MCF-7 de forma mais eficiente

do que o pamidronato. CLO também exibiu forte efeito antagonista sobre o estímulo de vários fatores de crescimento, inclusive de IGF-1, na proliferação de células de câncer de mama, quando comparado ao pamidronato (Fromigue *et al.*, 2003). Além da ação antitumoral dos BPs em células de câncer de mama, há trabalhos que mostram esse efeito *in vitro* em outros tumores, como câncer de próstata (Boissier *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2007), pulmão (Di Salvatore *et al.*, 2011), rins (Zwolak *et al.*, 2010), melanoma (Triba *et al.*, 2010) e carcinoma oral (Tamura *et al.*, 2011).

A redução da proliferação celular das MCF-7 após tratamento com ZOL sugere ação citotóxica deste BP. Desse modo, foram realizados ensaios de viabilidade por MTT mas, interessante, ZOL não alterou a viabilidade das células de câncer de mama nas concentrações estudadas. Com isso, avaliamos os efeitos dos BPs sobre as diferentes fases do ciclo celular, e vimos que ZOL reduziu a porcentagem de células na fase S e aumentou na fase G0/G1 do ciclo celular, ou seja, a redução do número de células após tratamento com ZOL é decorrente de uma redução da proliferação celular. Nosso resultado se assemelha a estudo prévio no qual células de câncer de mama MDA-MB-231 tratadas com 1 μ M de ZOL por 24 h mostraram maior número de células na fase G1 (Boissier *et al.*, 2000). Em estudo com células derivadas de carcinoma oral, foi encontrado aumento do número de células nas fases subG0 e S do ciclo celular, bem como redução nas fases G0/G1 e G2/M, de maneira dose-dependente após tratamento com ZOL (Tamura *et al.*, 2011).

Em seguida, foram analisados os efeitos dos BPs diretamente sobre células endoteliais derivadas de aorta de coelho (RAEC) e de cordão umbilical humano (HUVEC). Ambas as linhagens mostraram redução na proliferação, sem alterar a viabilidade celular quando tratadas diretamente com ZOL. Novamente CLO mostrou-se pouco efetivo sobre a redução da proliferação celular, com efeito discreto sobre as RAEC e nenhum efeito sobre as HUVEC. Até o presente momento, não há relatos sobre o uso de BPs em células endoteliais derivadas de coelho, assim como as RAEC. No entanto, nossos resultados estão de acordo com estudos que provaram a eficiência antiangiogênica do BPs em células endoteliais HUVEC *in vitro* ([Hamma-Kourbali et al., 2003](#)). Células HUVEC tratadas com 1 a 30 μ M de ZOL mostraram aumento da inviabilidade celular ([Wood et al., 2002](#)). [Walter](#) e colaboradores ([2010 e 2011](#)) relataram significativa redução da viabilidade de células HUVEC tratadas com concentrações variadas de ZOL, com platô de 50 μ M, enquanto CLO inibiu a proliferação celular apenas em concentrações elevadas, de 200 e 500 μ M. Em estudo utilizando diversos BPs, CLO também se mostrou pouco efetivo em relação à proliferação das HUVEC, sendo que a maior ação antiproliferativa foi verificada após tratamento com 5 a 50 μ M de ZOL ([Ziebart et al., 2011](#)). Em contrapartida, apenas 10 μ M de CLO resultaram em inibição da proliferação celular das HUVEC, segundo trabalho publicado por [Ribatti](#) e colaboradores ([2008](#)). HUVECs tratadas com 100 μ M de ZOL por 48 h mostraram 72% de apoptose, enquanto não houve morte celular na presença de baixas concentrações deste BP (1-30 μ M) ([Wood et al., 2002](#)).

A provável ação antiangiogênica dos BPs é reforçada pelo fato das células HUVEC apresentarem redução da proliferação após serem incubadas com meio previamente condicionado por células MCF-7 tratadas com ZOL. Novamente CLO não mostrou nenhum efeito nas concentrações testadas. As células RAEC não responderam à incubação com esse meio condicionado, provavelmente porque os produtos secretados pelas MCF-7, de linhagem celular humana, não são compatíveis com os receptores das células RAEC, de origem de coelho, conforme mencionado anteriormente.

Uma vez verificado o efeito indireto dos BPs sobre a proliferação das células endoteliais HUVEC através das células tumorais MCF-7, verificamos se há alguma alteração na capacidade das HUVEC para formar novos vasos sanguíneos *in vitro*. Houve significativa redução do número de tubos endoteliais formados, bem como da extensão de seus prolongamentos após incubação com meio condicionado pelas MCF-7 tratadas com ZOL, o que reforça o papel antiangiogênico deste BP. Paralelamente, esse mesmo meio condicionado foi testado *ex vivo* sobre a proliferação de células endoteliais provenientes de fragmentos de aorta murina. Os resultados revelam a ação antiangiogênica efetiva do ZOL, uma vez que foi observado menor número de células ao redor dos anéis de aorta. Novamente o tratamento com CLO não mostrou nenhum efeito. Vale ressaltar que os anéis de aorta murina responderam ao meio condicionado pelas MCF-7 tratadas com ZOL, diferentemente do que aconteceram com as células RAEC, oriundas da aorta de coelho. Provavelmente isso seja decorrente da homologia existente entre os receptores de VEGF humanos e murinos.

Em ensaio semelhante ao nosso, [Tang](#) e colaboradores ([2010](#)) mostraram que o meio condicionado por células MCF-7, em resposta a IGF-1 e tratadas com pamidronato ou CLO, reduziu significativamente a formação de tubos por células HUVEC em Matrigel. Também foi analisada a ação de ZOL, CLO, pamidronato e ibandronato em anéis de aorta de rato e em membranas corioalantóide de ovos de galinha, revelando uma redução do brotamento de células endoteliais ao redor desses anéis ([Wood et al., 2002](#); [Sylvest et al., 2009](#); [Stresing et al., 2011](#)). Por outro lado, existem dados mostrando inibição da formação de capilares em ensaio “vessel-like” e no isolamento de células endoteliais *in vivo* após tratamento de células HUVEC com 50 μ M de CLO ([Ribatti et al., 2008](#)).

Quantificamos as concentrações de VEGFA total e de sua isoforma antiangiogênica 165b no meio condicionado pelas células MCF-7. Verificamos que, dentre os produtos secretados pelas células tumorais, o tratamento com ZOL reduziu os níveis de VEGFA total e elevou os níveis de VEGFA_{165b}, quando comparado com células controle. Estes resultados explicam, em parte, a baixa proliferação das células endoteliais através de ação indireta, mediada pelas células neoplásicas MCF-7.

A molécula de VEGFA vem sendo intensamente estudada como alvo para abordagens antiangiogênicas, devido a sua habilidade em mediar a formação de vasos sanguíneos, além de desempenhar papel fundamental no crescimento e metástase do câncer ([Fenton et al., 2004](#)). No presente trabalho, houve aumento da expressão de VEGFA total e de suas isoformas VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅ e

VEGF_{165b} nas células MCF-7 tratadas com ZOL. É difícil precisar a resposta isolada do aumento da expressão de cada isoforma de VEGFA. Mesmo assim, apesar do aumento dos mRNAs das isoformas pró-angiogênicas, podemos sugerir que a função antiangiogênica de VEGFA_{165b} se sobrepõe ao estímulo pró-angiogênico das isoformas VEGFA₁₈₉, VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁, fato este suportado principalmente pelos ensaios em anéis de aorta e *vessel-like* com meio condicionado. Como mencionado anteriormente, [Tang](#) e colaboradores (2010) mostraram que clodronato e pamidronato suprimem a expressão de VEGFA na presença de IGF-1, utilizando nas mesmas células de nosso estudo, MCF-7. É importante ressaltar que os autores não avaliaram as expressões individuais de cada isoforma de VEGFA, apenas VEGFA total.

De acordo com a literatura, a expressão das isoformas de VEGFA é variável em neoplasias malignas, sendo o *splicing* de VEGFA dinâmico tanto em tecidos normais quanto em células malignas ([Grunstein et al., 2000](#); [Ferrara et al., 2003](#)). De maneira unânime, a superexpressão das diferentes isoformas de VEGFA aprimora a tumorigênese e o crescimento tumoral ([Ferrara et al., 1999](#)). Entretanto, uma das características mais marcantes, observada com relação às isoformas, é o padrão de vascularização, que parece ser determinado pelo predomínio de alguma variante. Por exemplo, o VEGFA₁₂₁ está envolvido na vascularização peritumoral devido a sua alta difusibilidade ([Potgens et al., 1995](#); [Grunstein et al., 2000](#); [Redondo et al., 2000](#); [Yu et al., 2002](#)), sendo associado com vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos peritumorais ([Küsters et al., 2003](#)). VEGFA₁₈₉ parece estar localizado de forma seletiva no núcleo celular

(Zhang *et al.*, 2000) e promove menos vasodilatação do que VEGFA₁₆₅ e VEGFA₁₂₁ (Küsters *et al.*, 2003).

Das isoformas de VEGFA, Ferrara (1999) considera VEGFA₁₂₁ e VEGFA₁₆₅ as mais predominantes no câncer de mama. Estas duas isoformas foram transfectadas em células MCF-7, a fim de se diferenciar o crescimento tumoral, função vascular e entrega de oxigênio nas células. Ambas isoformas foram associadas a uma densa rede de vasos sanguíneos neoformados e aumento do diâmetro vascular, porém, VEGFA₁₂₁ transfectada apresentou maior vascularização e rápido crescimento quando comparada a VEGFA₁₆₅ (Fenton *et al.*, 2004).

De acordo com outros estudos *in vitro* e *in vivo*, especula-se que VEGFA₁₂₁ tenha maior potencial tumorigênico e angiogênico do que VEGFA₁₆₅ em células de câncer de mama (Relf *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2001). Além disso, VEGFA₁₂₁ é mais expresso em melanoma (Yu *et al.*, 2002) e VEGFA₁₆₅ em glioblastomas (Berkman *et al.*, 1993). Acredita-se que essas diferenças ocorram devido à configuração entre as moléculas, com relação às variações na ligação à heparina, tamanho da isoforma ou difusividade. Outra hipótese é que as variações na expressão das isoformas possam conferir vantagens diferenciais sobre os tumores, já que eles se expandem em diferentes locais e cada neoplasia possui requisitos diferentes para a sua neovascularização (Grunstein *et al.*, 2000).

Zhang e colaboradores (1995) afirmam que linhagens de células de câncer de mama, incluindo a MCF-7, produzem baixos níveis de VEGF. Esses autores

observaram que a isoforma VEGF₁₂₁ é mais tumorigênica do que VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₉, em células MCF-7 transfectadas (Zhang *et al.*, 2000).

Muitos estudos vêm focando nas isoformas VEGFA₁₂₁ e VEGFA₁₆₅, porém a expressão de VEGFA₁₈₉ não tem sido bem compreendida. Hervé e colaboradores (2008) estudaram a expressão de VEGFA₁₈₉ em células de câncer de mama e avaliaram que esta isoforma estava relacionada com o aumento de citocinas que estimulavam a angiogênese, além de aumentarem a adesão das células tumorais através de integrinas específicas.

Em nosso trabalho, observamos aumento da expressão de VEGFA_{165b} nas células MCF-7 tratadas com ZOL, bem como aumento de seus níveis protéicos no meio condicionado por essas células. Até o momento, não há relatos sobre a expressão de VEGFA_{165b} em adenocarcinoma de mama, mas sabe-se que o mesmo é fracamente expresso em carcinomas de próstata (Woolard *et al.*, 2004), de rim (Bates *et al.*, 2002) e em melanomas (Pritchard-Jones *et al.*, 2007). Não foi possível analisar a expressão das isoformas antiangiogênicas VEGFA_{121b} e VEGFA_{189b} nas células MCF-7 tratadas com ZOL. Em tecidos normais, as variantes antiangiogênicas compreendem cerca de 90% dos mRNAs para VEGFA, sendo estas mais expressas em tecidos normais do que em tumores, uma vez que estas moléculas controlam negativamente o processo de angiogênese (Varey *et al.*, 2008). As isoformas antiangiogênicas participam do desenvolvimento ovariano e testicular (Artac *et al.*, 2009), reduzem a produção de leite durante a lactação (Qiu *et al.*, 2008) e sua ausência no primeiro trimestre de gravidez está associada com o desenvolvimento de patologias materno-fetais (Bills *et al.*, 2009). Ainda, o

mecanismo pelo qual as isoformas antiangiogênicas limitam o crescimento endotelial parece ser decorrente de uma fraca sinalização, desencadeada por sua ligação com o receptor VEGFR-2 ([Woolard et al., 2004](#); [Cebe et al., 2006](#)).

Existem evidências clínicas da ação antitumoral de BPs em pacientes com câncer de mama, os quais inibem o crescimento e estimulam a apoptose de células tumorais, e modificam os níveis de VEGF, permitindo melhor sobrevida de pacientes com a doença avançada ([Vicenzi et al., 2005](#); [Coleman et al., 2010](#); [Coleman, 2011](#)). Nosso estudo fornece evidências de que ZOL inibe funções vasculares endoteliais *in vitro* e *ex vivo*, de maneira mais eficaz que CLO, BP que não contém nitrogênio. Este efeito antiangiogênico parece ser decorrente da modulação dos mRNAs para VEGFA, com destaque para o aumento da expressão da isoforma VEGFA_{165b}. Assim sendo, nossos achados contribuem para um maior esclarecimento sobre a ação antiangiogênica dos BPs, visando melhorias para minimizar a morbidade de pacientes com tumores malignos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ ZOL reduz o número de células de câncer de mama e de células endoteliais através da inibição da proliferação, sem induzir morte celular. Em baixas concentrações, CLO não tem efeito antitumoral *in vitro* para as células MCF-7, assim como não reduz a proliferação de células endoteliais.
- ✓ ZOL mostrou ação antiangiogênica *in vitro* e *ex vivo* através do meio condicionado pelas células MCF-7 tratadas, uma vez que houve redução da proliferação celular e da formação de estruturas semelhantes a vasos pelas células endoteliais HUVEC, assim como redução da proliferação de células endoteliais a partir de anéis de aorta murina.
- ✓ ZOL modula a expressão de VEGFA total e de suas isoformas pró e antiangiogênicas em células de câncer de mama, MCF-7.
- ✓ ZOL reduz a quantidade de VEGFA total secretado pelas células MCF-7 tratadas, bem como aumenta a secreção da isoforma antiangiogênica 165b.
- ✓ Nas baixas concentrações estudadas dos BPs, próximas dos níveis séricos detectados em humanos, o BP contendo nitrogênio ZOL mostrou maior efeito antiangiogênico do que o BP que não contém nitrogênio, CLO.

8. REFERÊNCIAS

- Aapro MS, Coleman RE. Bone health management in patients with breast cancer: Current standards and emerging strategies. *Breast*. 2012 Feb;21(1):8-19.
- Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Mar;65(3):369-76.
- Aft R. Bisphosphonates in breast cancer: antitumor effects. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2011 Apr;9(4):292-9.
- AICR: *American Institution for Cancer Research*, Disponível em: <<http://www.aicr.org>> Acessado em janeiro de 2012.
- Amir E, Trinkaus M, Simmons CE, Dranitsaris G, Clemons MJ. Vascular endothelial growth factor activity after switching of bisphosphonate treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Pathol*. 2009 May;62(5):474-6.
- Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, Evans DG, Lalloo F, Narod SA, *et al*. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *Br J Cancer*. 2008 Apr 22;98(8):1457-66. Epub 2008 Mar 18.
- Artac RA, McFee RM, Smith RA, Baltes-Breitwisch MM, Clopton DT, Cupp AS. Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. *Biol Reprod*. 2009 Nov;81(5):978-88.
- Bárdos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*. 2004 Mar;26(3):262-9.
- Barros AC, Pinotti M, Teixeira LC, Ricci MD, Pinotti JA. Outcome analysis of patients with early infiltrating breast carcinoma treated by surgery with intraoperative evaluation of surgical margins. *Tumori*. 2005 Nov-Dec;90(6):592-

- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, *et al.* VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002 Jul 15;62(14):4123-31.
- Benzel EC, Ferrara LA, Roy S, Fleischman AJ. Biomaterials and implantable devices: discoveries in the spine surgery arena. *Clin Neurosurg.* 2002;49:209-25.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):401-10.
- Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, *et al.* Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J. Clin. Investig.* 1993; 91: 153–159.
- Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin.* 1995 Sep-Oct;45(5):263-78.
- Bills VL, Varet J, Millar A, Harper SJ, Soothill PW, Bates DO. Failure to up-regulate VEGF165b in maternal plasma is a first trimester predictive marker for pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond).* 2009 Jul;116(12):873.
- Body JJ. Current and future directions in medical therapy: hypercalcemia. *Cancer.* 2000 Jun 15;88(12 Suppl):3054-8.
- Body JJ. The risk of cumulative renal effects of intravenous bisphosphonates. *Support Cancer Ther.* 2006 Jan 1;3(2):77-83.
- Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Mignetto S, Ebetino FH, Colombel M, *et al.* Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 2000 Jun 1;60(11):2949-54.
- Bossung V, Harbeck N. Angiogenesis inhibitors in the management of breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010 Feb;22(1):79-86.
- Brown NS, Bicknell R. Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J.* 1998 Aug 15;334 (Pt 1):1-8.
- dalle Carbonare L, Valenti MT, Azzarello G, Balducci E, Crepaldi G, Realdi G, *et al.* Bisphosphonates decrease telomerase activity and hTERT

expression in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Aug 30;240(1-2):23-31.

- Carey JJ, Palomo L. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: innocent association or significant risk? *Cleve Clin J Med*. 2008 Dec;75(12):871-9.
- Carey K. Avastin loses breast cancer indication. *Nat Biotechnol*. 2012 Jan 9;30(1):6.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, *et al*. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Nat Med*. 1999 May;5(5):495-502.
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011a; 473 (7347): 298-307.
- Carmeliet P e Jain R K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature reviews drug discovery*. 2011b; 24(10).
- Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):289-97.
- Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreeta J, *et al*. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer*. 2010; 31(9):320.
- Cebe SS, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, *et al*. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci*. (2006) 63: 2067–2077.
- Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, *et al*. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol*. 2002 Nov;42(11):1228-36.
- Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY, Chung LP. Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in

the malignant transformation of lung and colon. *Hum. Pathol.* 1998; 29: 910–914.

- Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Ruggiero M. Oncogenes, p53, and tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1998;124(9):523-5.
- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC *et al.* Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990; 172, 1535-1545.
- Clézardin P, Ebetino FH, Fournier PG. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):4971-4.
- Clézardin P, Fournier P, Boissier S, Peyruchaud O. In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. *Curr Med Chem.* 2003 Jan;10(2):173-80.
- Clines GA, Guise TA. Mechanisms and treatment for bone metastases. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2004 May;2(5):295-302.
- Clines GA, Guise TA. Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* (2005);12, 549-583
- Coleman RE. Bisphosphonates in breast cancer. *Ann Oncol.* 2005 May;16(5):687-95.
- Coleman RE, McCloskey EV. Bisphosphonates in oncology. *Bone*, 2011 Jul;49(1):71-6.
- Cremers SC, Papapoulos SE, Gelderblom H, Seynaeve C, den Hartigh J, Vermeij P, *et al.* Skeletal retention of bisphosphonate (pamidronate) and its relation to the rate of bone resorption in patients with breast cancer and bone metastases. *J Bone Miner Res.* 2005 Sep;20(9):1543-7.
- Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ, Hijzen A, Shipman CM, Lippitt J, *et al.* Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res.* 2003 Mar;18(3):482-92.

- Crum CP. Trato genital e mama femininos. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Fundamentos de Patologia Estrutural e Funcional. 5a ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.936-1002.
- Dannemann C, Grätz KW, Riener MO, Zwahlen RA. Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: a severe secondary disorder. Bone. 2007 Apr;40(4):828-34.
- Daubiné F, Fournier PG, Lundy MW, Rogers MJ, Ebetino FH, Clézardin P. Lowering bone mineral affinity of bisphosphonates as a therapeutic strategy to optimize skeletal tumor growth inhibition in vivo. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8945-53.
- Defino HL, Vendrame JR. Role of cortical and cancellous bone of the vertebral pedicle in implant fixation. Eur Spine J. 2001 Aug;10(4):325-33.
- Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. Nat Rev Cancer. 2008 Sep;8(9):705-13.
- Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CY, Rajasekeran S, *et al.* Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. Clin Cancer Res. 2007 Jul 1;13(13):3942-50.
- Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. Mayo Clin Proc, 2008 Sep;83(9):1032-45.
- Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. Clin Cancer Res. 2009 Aug 15;15(16):5020-5.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991 Nov;19(5):403-10
- Falcone DJ, McCaffrey TA, Haimovitz-Friedman A, Garcia M. Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. J Cell Physiol. 1993 Jun;155(3):595-605.
- Fenton BM, Paoni SF, Liu W, Cheng SY, Hu B, Ding I. Overexpression of VEGF121, but not VEGF165 or FGF-1, improves oxygenation in MCF-7 breast tumours. Br J Cancer. 2004 Jan 26;90(2):430-5.

- Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1359-64.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25(4):581-611.
- Ferrara N. VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795–803.
- Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, *et al.* Differential expression of the angiogenic factor genes VEGF and EG-VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am. J. Path.* 2003; 162, 1881-1893.
- Ferrara N, and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18: 4–25.
- Fleisch H, Russell RG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature.* 1966 Nov 26;212(5065):901-3.
- Fleisch H. Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Recent Results Cancer Res.* 1989;116:1-28.
- Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res.* 2002;4(1):30-4.
- Fleisch H. Orthopade. Introduction to bisphosphonates. History and functional mechanisms. 2007 Feb;36(2):103-4, 106-9.
- Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):157-212.
- Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med.* 1995 Jan;1(2):120-2.
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 1971 Feb 1;133(2):275-88
- Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cabon F, Colombel M, *et al.* Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated

vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6538-44.

- Fromiguet O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res.* 2000 Nov;15(11):2211-21.
- Galasko, C.S.B. (1981) *The Anatomy and Pathways of Skeletal Metastases* (Weiss, I. and Gilbert, A.H., series eds), GK Hall, Boston.
- Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men: a population-based study. *Cancer.* 2004 Jul 1;101(1):51-7.
- Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, *et al.* Tumor necrosis factor- α regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):22128-35.
- van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr).* 2011 Apr;34(2):71-88.
- Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marm   D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25915-9.
- Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F, Johnson RS. Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor Act in a Coordinate Fashion To Recruit and Expand Tumor Vasculature *Mol Cell Biol.* 2000; 20(19):7282-91.
- Guarneri V, Miles D, Robert N, Di  ras V, Glaspy J, Smith I, *et al.* Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(1):181-8.
- Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev.* 1998 Feb;19(1):18-54.
- Guo P, Xu L, Pan S, Brekken RA, Yang ST, Whitaker GB, *et al.* Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. *Cancer Res.* 2001 Dec 1;61(23):8569-77.
- Hadji P, Aapro MS, Body JJ, Bundred NJ, Brufsky A, Coleman RE, *et al.* Management of aromatase inhibitor-associated bone loss in postmenopausal women with breast cancer: practical guidance for

prevention and treatment. *Ann Oncol*. 2011 Dec;22(12):2546-55. Epub 2011 Mar 17.

- Hamma-Kourbali Y, Di Benedetto M, Ledoux D, Oudar O, Leroux Y, *et al*. A novel non-containing-nitrogen bisphosphonate inhibits both in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 24;310(3):816-23.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
- Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*. 2008 Nov;8(11):880-7.
- Harrison TR, Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, *et al*. *Medicina Interna*. 17a. Ed., Rio de Janeiro: McGraw Hill: Artmed: AMGH, 2008. P.563-70.
- Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Ogata S, *et al*. Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Mar 9;354(2):478-84.
- Hervé MA, Buteau-Lozano H, Vassy R, Bieche I, Velasco G, Pla M, *et al*. Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. *Am J Pathol*. 2008 Jan;172(1):167-78.
- Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol*. 1999 Sep;141(3):195-210.
- Holen I, Coleman RE. Anti-tumour activity of bisphosphonates in preclinical models of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(6):214.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. 1991 Dec;5(12):1806-14.
- INCA: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acessado em janeiro de 2012.

- Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1973 Nov;52(11):2757-64.
- Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H A, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer.* 2001 Apr 20;84(8):1126-34.
- Jain RK, Duda DG. Role of bone marrow-derived cells in tumor angiogenesis and treatment. *Cancer Cell.* 2003 Jun;3(6):515-6.
- Käkönen SM, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer.* 2003 Feb 1;97(3 Suppl):834-9.
- Kalluri R. Basement membranes: structural features, assembly, cellular interactions and role in cancer angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 .
- Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol.* 2002 Jan;4(1):E2-5.
- Kars MD, Işeri OD, Ural AU, Gündüz U. In vitro evaluation of zoledronic acid resistance developed in MCF-7 cells. *Anticancer Res.* 2007 Nov-Dec;27(6B):4031-7.
- Kavanagh KL, Dunford JE, Bunkoczi G, Russell RG, Oppermann U. The crystal structure of human geranylgeranyl pyrophosphate synthase reveals a novel hexameric arrangement and inhibitory product binding. *J Biol Chem.* 2006 Aug 4;281(31):22004-12.
- KL, Guo K, Dunford JE, Wu X, Knapp S, Ebetino FH, *et al.* The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 16;103(20):7829-34.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, *et al.* Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):678-85.
- Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol.* 1999 Aug;6(8):R217-24.
- de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, *et al.* Normalization of gene expression measurements in tumor tissues:

comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 2005 Jan;85(1):154-9.

- Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 1;12(17):5018-22.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by ntussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 2003 Apr;18:65-70.
- Küsters B, de Waal RM, Wesseling P, Verrijp K, Maass C, Heerschap A, *et al.* Differential effects of vascular endothelial growth factor A isoforms in a mouse brain metastasis model of human melanoma. *Cancer Res*
- Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF 183. *Biochim Biophys Acta* 1998;14443:400–6.
- Lewis BJ, Conry RM. Câncer de mama. In: Benett JC, Plum F. *Tratado de medicina interna.* 20^a ed, v. 2, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.1461-66.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):253-70.
- Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996 Feb;18(2):75-85.
- Lipton A, Steger GG, Figueroa J, Alvarado C, Solal-Celigny P, Body JJ, *et al.* Extended efficacy and safety of denosumab in breast cancer patients with bone metastases not receiving prior bisphosphonate therapy. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15;14(20):6690-6.
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 1998 Apr;13(4):581-9.
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, *et al.* Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J. Biol. Chem.* 2001 276, 15240–15248.
- McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):713-25.

- McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol Biol*. 2007 Nov 27;8:107.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-8.
- Miao H, Verkooijen HM, Chia KS, Bouchardy C, Pukkala E, Larønningen S, *et al*. Incidence and outcome of male breast cancer: an international population-based study. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4381-6.
- Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*. 1996;49(1-3):117-37.
- Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Polverini PJ, Strieter RM. Angiogenesis. 1998;2(2):123-34. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis.
- Morgan C, Lewis PD, Jones RM, Bertelli G, Thomas GA, Leonard RC. The in vitro anti-tumour activity of zoledronic acid and docetaxel at clinically achievable concentrations in prostate cancer. *Acta Oncol*. 2007;46(5):669-77.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res*. 1995 Dec 15;55(24):6161-5.
- Mundy GR. Endothelin-1 and osteoblastic metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):10588-9.
- Naliwaiko K, Luvizon AC, Donatti L, Chammas R, Mercadante AF, Zanata SM, *et al*. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. *Chem Biol Interact*. 2008 May 28;173(2):122-8.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growthfactor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9–22.
- Ngamphaiboon N, Frustino JL, Kossoff EB, Sullivan MA, O'Connor TL. Osteonecrosis of the jaw: dental outcomes in metastatic breast cancer

patients treated with bisphosphonates with/without bevacizumab. Clin Breast Cancer. 2011 Aug;11(4):252-7.

- Norrby K. J Cell Mol Med. In vivo models of angiogenesis. 2006 Jul-Sep;10(3):588-612.
- O'Reilly, M. S. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. EXS. 1997a 79, 273–294.
- O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 1997b 88, 277–285.
- Pabst AM, Ziebart T, Koch FP, Taylor KY, Al-Nawas B, Walter C. The influence of bisphosphonates on viability, migration, and apoptosis of human oral keratinocytes-in vitro study. Clin Oral Investig. 2012 Feb;16(1):87-93.
- Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 May;282(5):C947-70.
- Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol. Biol. Cell. 1993 4: 1317–1326.
- Peter Devilee; Fattaneh A. Tavassoli. World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Oxford University, 2003.
- Pintavorn P, Ballermann BJ. TGF-beta and the endothelium during immune injury. Kidney Int. 1997 May;51(5):1401-12.
- Plunkett TA, Smith P, Rubens RD. Risk of complications from bone metastases in breast cancer. implications for management. Eur J Cancer. 2000 Mar;36(4):476-82.
- Polgár C, Major T. Current status and perspectives of brachytherapy for breast cancer. Int J Clin Oncol. 2009 Feb;14(1):7-24.
- Potgens, A. J. G., Lubsen, N. H., van Altena, M. C., Schoenmakers, J. G. G., Ruiter, D. J., and de Waal, R. W. W. Vascular permeability factor expression influences tumor angiogenesis in human melanoma lines xenografted to nude mice. Am. J. Pathol., 146: 197–209, 1995.

- Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, *et al.* VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151–8.
- Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, *et al.* Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2007 Jul 16;97(2):223-30.
- Pyriochou A, Tsigkos S, Vassilakopoulos T, Cottin T, Zhou Z, Gourzoulidou E, *et al.* Anti-angiogenic properties of a sulindac analogue. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(8):1207-14.
- Qiu Y, Bevan H, Weeraperuma S, Wrattin D, Murphy D, Neal CR, *et al.* Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J*. 2008 Apr;22(4):1104-12.
- Redondo P, Bandres E, Solano T, Okroujnov I, and Garcia-Foncillas. J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and melanoma. N-acetylcysteine down-regulates VEGF production in vitro. *Cytokine* 2000; 12: 374–378.
- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, *et al.* Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):963-9.
- Rennel E, Waine E, Guan H, Schöler Y, Leenders W, Woolard J, *et al.* The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer*. 2008 Apr 8;98(7):1250-7.
- Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ, Wheatley ER, Stewart L, Mather S, *et al.* VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer*. 2009 Oct 6;101(7):1183-93
- Ribatti D, Guidolin D, Marzullo A, Nico B, Annese T, Benagiano V, *et al.* Mast cells and angiogenesis in gastric carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2010 Aug;91(4):350-6.
- Ribatti D, Maruotti N, Nico B, Longo V, Mangieri D, Vacca A, *et al.* Clodronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2008 May;19(5):1109-12.

- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
- Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2692-6.
- Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 15;12.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. *Aust Endod J*. 2009 Dec;35(3):119-30.
- Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr;1068:367-401.
- Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years *Bone*, 2011 Jul;49(1):2-19.
- Russell RG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporos Int*. 1999;9 Suppl 2:S66-80.
- Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res*. 1970;6(3):183-96.
- di Salvatore M, Orlandi A, Bagalà C, Quirino M, Cassano A, Astone A, *et al*. Anti-tumour and anti-angiogenetic effects of zoledronic acid on human non-small-cell lung cancer cell line. *Cell Prolif*. 2011 Apr;44(2):139-46.
- Santini D, Vincenzi B, Avvisati G, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, *et al*. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2002 May;8(5):1080-4.
- Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, Avvisati G, Massacesi C, Battistoni F, *et al*. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of

circulating angiogenic factors in cancer patients. Clin Cancer Res. 2003 Aug 1;9(8):2893-7.

- Santini D, Vincenzi B, Hannon RA, Brown JE, Dicuonzo G, Angeletti S, *et al.* Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. Oncol Rep. 2006 May;15(5):1351-7.
- Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. Br J Cancer. 2000 Apr;82(8):1459-68.
- Silva AS, Ropelatto C, Filippini CAF, Bianchini E, Bagatinil F, Brocardo GA, *et al.* Ocorrência de câncer de mama no Brasil e no Estado de Santa Catarina. Newslab 2002; 98: 100.
- Silverman SL, Cummings SR, Watts NB; Consensus Panel of the ASBMR, ISCD, and NOF. Recommendations for the clinical evaluation of agents for treatment of osteoporosis: consensus of an expert panel representing the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), the International Society for Clinical Densitometry (ISCD), and the National Osteoporosis Foundation (NOF). J Bone Miner Res. 2008 Jan;23(1):159-65.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell, 1998 92: 735–745.
- Soltau J, Zirrgiebel U, Esser N, Schächtele C, Totzke F, Unger C, *et al.* Antitumoral and antiangiogenic efficacy of bisphosphonates in vitro and in a murine RENCA model. Anticancer Res. 2008 Mar-Apr;28(2A):933-41.
- Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, *et al.* Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2002 Jul;8(7):2253-9.
- Stresing V, Fournier PG, Bellahcène A, Benzaïd I, Mönkkönen H, Colombel M, *et al.* Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. Bone. 2011 Feb;48(2):259-66.
- Sylvest L, Bendiksen CD, Houen G. Phosphatase inhibitors with anti-angiogenic effect in vitro. APMIS. 2010 Jan;118(1):49-59

- Tamura T, Shomori K, Nakabayashi M, Fujii N, Ryoke K, Ito H. Zoledronic acid, a third-generation bisphosphonate, inhibits cellular growth and induces apoptosis in oral carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2011 Apr;25(4):1139-43.
- Tang X, Zhang Q, Shi S, Yen Y, Li X, Zhang Y, *et al.* Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1alpha/VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2010 Jan 1;126(1):90-103.
- Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Effect of zoledronic acid on serum angiogenic factors in patients with bone metastases. *Med Oncol.* 2008;25(3):346-9.
- Taylor M, Rössler J, Geoerger B, Vassal G, Farace F. New anti-angiogenic strategies in pediatric solid malignancies: agents and biomarkers of a near future. *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 Jul;19(7):859-74.
- *The Angiogenesis Foundation Disponível em:* <http://www.angio.org/understanding/process.php> > Acessado em novembro de 2011.
- Theriault RL. Bisphosphonates: ready for use as adjuvant therapy of breast cancer? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010 Feb;22(1):61-6.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991 Jun 25;266(18):11947-54.
- di Tomaso E, London N, Fuja D, Logie J, Tyrrell JA, Kamoun W, *et al.* PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS One.* 2009;4(4):e5123.
- Tong YJ, Zhang M, Zou P, Guo R. Inhibiting effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) antisense oligodeoxynucleotides on VEGF expression in U937 cell. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2004 Apr;12(2):151-3.
- Triba MN, Starzec A, Bouchemal N, Guenin E, Perret GY, Le Moyec L. Metabolomic profiling with NMR discriminates between biphosphonate and doxorubicin effects on B16 melanoma cells. *NMR Biomed.* 2010 Nov;23(9):1009-16.

- Ucuizian AA, Greisler HP. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg.* 2007 Apr;31(4):654-63.
- Valachis A, Polyzos NP, Patsopoulos NA, Georgoulas V, Mavroudis D, Mauri D. Bevacizumab in metastatic breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(1):1-7.
- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, *et al.* The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer.* 2006 Mar 3;6:49.
- Van den Wyngaert T, Huizing MT, Fossion E, Vermorken JB. Bisphosphonates in oncology: rising stars or fallen heroes. *Oncologist.* 2009 Feb;14(2):181-91.
- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, *et al.* VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer.* 2008 Apr 22;98(8):1366-79.
- Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2007 Feb 8;246(1-2):308-12.
- Véronique Masson, Laetitia Devy, Christine Grignet-Debrus, Sarah Bernt, Khalid Bajou, Silvia Blacher, *et al.* Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol. Proced. Online* 2002;4(1): 24-31.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996 Apr 15;93(8):1493-5.
- Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, La Cesa A, *et al.* Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Mar;25(3):144-51.
- Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G, Battistoni F, Gavasci M, La Cesa A, *et al.* *J Interferon Cytokine Res.* 2005 Mar;25(3):144-51.
- Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Brest Cancer res. Treat.* 1995 36, 119-126.

- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1994., 269: 26988–26995
- Walter C, Klein MO, Pabst A, Al-Nawas B, Duschner H, Ziebart T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig.* 2011 Feb;14(1):35-41.
- Whittle C, Gillespie K, Harrison R, Mathieson PW, Harper SJ. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci (Lond).* 1999 Sep;97(3):303-12.
- Winter MC, Holen I, Coleman RE. Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008 Aug;34(5):453-75.
- Winter MC, Coleman RE. Bisphosphonates in breast cancer: teaching an old dog new tricks. *Curr Opin Oncol.* 2009 Nov;21(6):499-506.
- Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, *et al.* Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Sep;302(3):1055-61.
- Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, *et al.* VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 2004 Nov 1;64(21):7822-35.
- Yan T, Yin W, Zhou Q, Zhou L, Jiang Y, Du Y, *et al.* The efficacy of zoledronic acid in breast cancer adjuvant therapy: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer.* 2012 Jan;48(2):187-95.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
- Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, *et al.* Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):4015-23.

- Yu JL, Rak JW, Klement G, Kerbel RS. Vascular Endothelial Growth Factor Isoform Expression as a Determinant of BloodVessel Patterning in Human Melanoma Xenografts. *Cancer Research* 2002; 15: (62) 1838–1846.
- Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):477-88.
- Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, *et al.* The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 2000 Jul;83(1):63-8.
- Ziebart T, Pabst A, Klein MO, Kämmerer P, Gauss L, Brüllmann D, *et al.* Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clin Oral Investig.* 2011 Feb;15(1):105-11.
- Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, *et al.* Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004 Feb 6;94(2):230-8.
- Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, *et al.* Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Jan;92(1):162-8.



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Caracterização dos mecanismos antiangiogênicos de bisfosfonatos em linhagem celular derivada de câncer de mama" (protocolo nº 2492-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Karina Gottardello Zecchin / Camilla Borges Ferreira Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 23 de agosto de 2011.

Campinas, 23 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva